

Biološki učinak vodenog ekstrakta jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) na in vitro modelima probavnog sustava

Hadžiomerađić, Esma

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:820131>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023

Esma Hadžiomerađić

**BIOLOŠKI UČINAK VODENOG
EKSTRAKTA JAGODE (*Fragaria
ananassa* × Duch.) NA *IN VITRO*
MODELIMA PROBAVNOG
SUSTAVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Ane Huđek Turković, mag. ing. biotechn. i Anice Bebek Markovinović, mag. ing. techn. aliment.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog HRZZ projekta: „Tehnologija preprekama i 3D printanje za okolišno prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3DSustJuice)“ (IP-2019-04-2015), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr.sc. Kseniji Durgo na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada, znanstvenom i stručnom znanju, savjetima, i kritikama koje je nesebično djelila samnom. Hvala Vam od srca na razumijevanju, strpljenju, i svojoj podršci tijekom cijelog procesa izrade rada. Učinili ste za mene ovo iskustvo kojim zatvaram jedno poglavlje svog života izuzetno lijepim i nezaboravnim. Također, zahvaljujem se asistentici mag.ing Ani Huđek Turković na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada kao i na savjetima i podršci koju mi je pružila.

Želim se zahvaliti svim prijateljima koji su mi uljepšali dane provedene na fakultetu. Također hvala i mojim prijateljima u Sarajevu koji su sve ove godine studiranja bili moja podrška i oslonac.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji, roditeljima, sestri Naidi i neni Izeti koji su mi bili i ostaju najveća podrška ne samo tijekom obrazovanja već i tijekom cijelog mog života. Hvala vam na neizmornoj ljubavi, razumijevanju i povjerenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKI UČINAK VODENOG EKSTRAKTA JAGODE (*Fragaria ananassa* × Duch.) NA IN VITRO MODELIMA PROBAVNOG SUSTAVA

Esma Hadžiomerađić, univ.bacc. mol.bio.

0119040027

Sažetak: Jagoda (*Fragaria ananassa* × Duch.) predstavlja bogat izvor biološki i farmakološki aktivnih polifenolnih spojeva koji imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Cilj ovog rada je ispitati biološki učinak jagode na različitim biološkim sustavima uključujući humane stanične linije predstavnike mikroflore čovjeka (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*), i modelnu DNA, plazmid phiX174. U tu svrhu korištene su metode Neutral red za određivanje citotoksičnosti ekstrakta na humanim staničnim linijama, DCFH-DA za određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja na humanim staničnim linijama, agarozna elektroforeza za određivanje genoprotektivnog učinka te protokol za utvrđivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta. Dobiveni rezultati pokazali su da vodeni ekstrakt jagode djeluje citotoksično na staničnu liniju adenokarcinoma debelog crijeva i karcinoma epitela usne šupljine. Ekstrakt jagode nije pokazao antioksidacijsko djelovanje niti na ijednoj staničnoj liniji. Utvrđen je i genoprotektivni učinak jagode na modelnoj DNA. Biološki aktivni spojevi u ekstraktu jagode pokazali su antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, *L. fermentum* i *S. aureus*.

Ključne riječi: jagoda, citotoksičnost, antioksidativno djelovanje, humane stanične linije, bakterije

Rad sadrži: 58 stranica, 24 slike, 4 tablice, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: Ana Huđek Turković, mag. ing. biotechn. i Anica Bebek Markovinović, mag. ing. techn. aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (zamjenski član)

Datum obrane: 06. travnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular biotechnology

BIOLOGICAL EFFECT OF AQUEOUS STRAWBERRY (*Fragaria ananassa* × Duch.) EXTRACT ON *IN VITRO* MODELS OF DIGESTIVE SYSTEM

Esma Hadžiomeragić, univ. bacc. mol. bio.

0119040027

Abstract: Strawberry (*Fragaria ananassa* × Duch.) is a source of biologically and pharmacologically active polyphenols that have beneficial effects on human health. The aim of this work is to investigate the biological effect of strawberry extract on different biological systems, including human cell lines, human microflora (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*), and model DNA, plasmid phiX174. Various methods were used, including Neutral red to determine cytotoxicity to human cell lines, DCFH-DA to determine prooxidant/antioxidant effect on human cells, agarose electrophoresis to determine genoprotective effect, and a protocol to determine antimicrobial effect of the extract. The results showed that the strawberry extract has a cytotoxic effect on adenocarcinoma cells of the colon and epithelial carcinoma cells of the oral cavity. The strawberry extract showed no antioxidant effect on any of the cell lines studied. The strawberry extract showed genoprotective effect on the model DNA. Biologically active compounds in the extract showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, *L. fermentum* and *S. aureus*.

Keywords: *strawberry, human cell lines, bacteria, cytotoxicity, antioxidant effect, prooxidant effect*

Thesis contains: 58 pages, 24 figures, 4 tables, 58 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ksenija Durgo, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Ana Huđek Turković, mag. ing. biotechn. and Anica Bebek Markovinović, mag. ing. techn. aliment.

Reviewers:

1. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (president)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: April 6th 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Funkcionalna hrana	2
2.2. Jagoda (<i>Fragaria ananassa</i> × Duch.)	4
2.3. Biološki aktivni spojevi jagode	6
2.3.1. Polifenoli	6
2.4. Reaktivne kisikove vrste i oksidativni stres	8
2.4.1. Antioksidansi	9
2.4.2. Prooksidansi.....	10
2.4.3. Oštećenja DNA.....	11
2.5. Predstavnici mikrobiote (patogeni karakter/normalna mikroflora).....	13
2.5.1. <i>Escherichia coli</i>	13
2.5.2. <i>Lactobacillus fermentum</i>	14
2.5.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Biljni materijal	17
3.1.2. Biološki test sustavi	17
3.1.2.1. Humane stanične linije.....	17
3.1.2.2. Modelni sustav DNA	18
3.1.2.3. Mikroorganizmi	18
3.1.3. Laboratorijski uređaji	18
3.1.4. Laboratorijski pribor.....	19
3.1.5. Kemikalije	20
3.1.5.1. Otopine.....	20

3.1.5.2. Hranjive podloge.....	22
3.1.6. Programi za obradu podataka	24
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Ekstrakcija jagode.....	24
3.2.2. Određivanje bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta jagode.....	24
3.2.3. Uzgoj stanica za određivanje citotoksičnog i oksidativnog učinka.....	25
3.2.4. Priprema i utvrđivanje koncentracije stanica.....	25
3.2.5. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na humane stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27, HepG2)	25
3.2.6. Testiranje oksidacijskog učinka ekstrakta jagode na humane stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27, HepG2)	27
3.2.7. Testiranje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta jagode na modelnoj DNA	28
3.2.8. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na predstavnike humane mikroflore	30
3.2.9. Obrada podataka	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Rezultati određivanja bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta jagode.....	33
4.2. Rezultati određivanja citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama.....	34
4.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama	39
4.4. Rezultati određivanja genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta jagode na modelnoj DNA	44
4.5. Rezultati citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na predstavnike humane mikroflore	46
5. ZAKLJUČCI.....	50
6. LITERATURA.....	51

1. UVOD

Jagoda (*Fragaria ananassa* × Duch.), biljka niskog rasta i prepoznatljivog crvenog ploda iz porodice ruža (*Rosaceae*) se zbog svog bioaktivnog sastava svrstava u funkcionalnu hranu. Funkcionalnom hranom smatraju se sve namirnice čija konzumacija ima pozitivan učinak na zdravlje ljudi, odnosno pomažu u sprječavanju i kontroli kroničnih oboljenja, smanjuju upalne procese u tijelu, te pozitivno utječu i na mentalnu stabilnost. Biološki i farmakološki aktivne tvari prisutne u ekstraktu jagode, zbog kojih se ubraja u funkcionalnu hranu i ima terapijski potencijal, jesu polifenoli. Polifenolni spojevi imaju snažno antioksidacijsko djelovanje, te konzumacija biljaka koje ih sadrže kao što je jagoda, može dovesti do smanjenja rizika od kroničnih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom kao što je rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, te neurodegenerativna oboljenja. Polifenoli također imaju i antimikrobnu aktivnost. Tako konzumacija namirnica u čijem sastavu se nalaze polifenoli, može dovesti i do smanjenja rizika od različitih bakterijskih i viralnih infekcija.

U skladu s navedenim, očekuje se da će ekstrakt jagode pokazati antioksidacijski učinak na humanim staničnim linijama, genoprotektivni učinak na modelnoj DNA, kao i antimikrobno djelovanje na patogene bakterije.

Cilj ovog rada je bio ispitati citotoksično djelovanje vodenog ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama adenokarcinoma epitela želuca AGS, pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2. Također je ispitan antimikrobni učinak ekstrakta na neke od glavnih predstavnika humane mikrobiote (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*). Ujedno je testirano i potencijalno antioksidativno djelovanje na humanim staničnim linijama kao i potencijalni genoprotektivni učinak od oksidacijskih oštećenja induciranih UV zračenjem na modelnom genetičkom materijalu, plazmidu phiX174.

Rezultati ovog istraživanja pokazat će djeluje li ekstrakt jagode citotoksično na humane stanične linije, protektivno na stanični genetički materijal, te da li inhibira rast patogenih mikroorganizama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FUNKCIONALNA HRANA

"Prehrana je pola zdravlja", svima dobro poznata izreka, u današnje vrijeme dobija sve veću važnost. Kraj 20.-og i početak 21.-og stoljeća, obilježio je ogroman porast kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa tipa 2., alergija i raka kod ljudi. Ono što posebice zabrinjava jest činjenica da se ova oboljenja sve više javljaju kod mlađe populacije između 20.-e i 30.-e godine života. Pored genetičke predispozicije, ustanovljeno je da nezdrav stil života, odnosno stres, pušenje, manjak tjelesne aktivnosti te nepravilna prehrana značajno doprinose razvoju i progresiji ovih bolesti. Stoga se sve više radi na promociji zdrave i pravilne prehrane kao jedne od strategija prevencije i kontrole kroničnih oboljenja. U tome veliku ulogu ima promocija konzumacije funkcionalne hrane te proizvoda baziranih na istoj (EUFIC, 2006).

Prema definiciji, funkcionalna hrana predstavlja svu hranu koja sadrži biološki aktivne komponente i ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Koncept funkcionalne hrane uspostavljen je 1980.-ih u Japanu, gdje su zdravstveni djelatnici prepoznali da produženje životnog vijeka direktno prati kvaliteta življenja. Tako je prepoznato da hrana koja ima važne bioaktivne sastojke utječe na zdravlje i smanjuje rizik od nastanka i razvoja kroničnih oboljenja (EUFIC, 2006).

Glavna i osnovna svrha unosa hrane je zadovoljavanje metaboličkih potreba te opskrbljivanje tijela potrebnim nutrijentima. Kako bi se namirnica svrstala u funkcionalnu hranu, postoji nekoliko kriterija koje mora zadovoljiti. Prvi kriterij je da se radi o hrani nastaloj od prirodnih sastojaka, a ne nekoj vrsti praha ili tablete. Drugi kriterij je da se ta namirnica može i treba konzumirati kao dio redovne prehrane. Treći kriterij je da unešena namirnica ima određenu funkciju, odnosno da regulira neki fiziološki proces u tijelu kao što je prevencija i oporavak od određenih bolesti, kontrola fizičkih i mentalnih poremećaja, ili usporavanje procesa starenja (Granato i sur., 2019). Postoji veliki broj znanstvenih spoznaja proizašlih iz istraživanja provedenih na staničnim kulturama i životinjama o pozitivnim učincima funkcionalne hrane u prevenciji i/ili liječenju karcinoma, kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, hipertenzije te bakterijskih i viralnih infekcija (Rincón-León, 2003).

Neki od primjera funkcionalne hrane su namirnice koje sadrže određene vitamine, minerale, nezasićene masne kiseline, vlakna, kao i dodatne biološki aktivne komponente kao što su polifenoli, terpenoidi, steroli ili drugi antioksidansi i probiotici (EUFIC, 2006).

Interes za funkcionalnu hranu kao komplementarnu terapiju u prevenciji i kontroli bolesti porasao je u posljednjih nekoliko desetljeća te se uporaba funkcionalne hrane našla dijelom brojnih planova prehrane, kao što je to slučaj s mediteranskom dijetom (Alkhatib i sur., 2017).

Brojna *in vivo* i *in vitro* znanstvena istraživanja pokazala su da predstavnici funkcionalne hrane koji imaju poseban značaj za ljudsko zdravlje su voće i povrće (Bursać Kovačević i sur., 2020). Jagodasto voće uključujući borovnice, brusnice, maline i jagode sadrži brojne biološki aktivne molekule, vlakna, vitamine i minerale. Glavne bioaktivne sastavnice u jagodastom voću su polifenoli, uključujući flavonoide, tanine i fenolne kiseline. Obzirom na visoku koncentraciju polifenola, jagodasto voće, kao i njihovi proizvodi, pozitivno utječu na smanjenje oksidacijskog stresa te upalnih procesa u tijelu, što su najčešće vodeći uzroci dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja, raka i neuroloških oboljenja (Golovinskaia i Wang, 2021).

Kako je prethodno spomenuto, u posljednjih par desetljeća, promocija funkcionalne hrane i stvaranje proizvoda na bazi istih doživjela je veliki porast, obzirom na pokazane učinke na ljudsko zdravlje. Jedan od proizvoda proizveden prema konceptu funkcionalne hrane je i „jestivi“ *snack* suvenir grada Zagreba, licitarsko srce pod nazivom „Jagodica Purgerica“ (slika 1). Ovaj proizvod osmišljen je i proizveden u sklopu aktivnosti znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost "Tehnologija preprekama i 3D printanje za okolišno prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova" pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević. Jedan od ciljeva projekta bio je razviti 3D ispisani proizvod na bazi jagode, kao bitnog predstavnika funkcionalne hrane, uz dodatak različitih škrobnih nosača. Ovaj proizvod pored inovativne i ekološki napredne održive tehnologije 3D ispisa, predstavlja izvrstan izvor važnih nutrijenata, čijom konzumacijom, obzirom da u svom sastavu ne sadrži aditive ni konzervanse, se zadovoljava dnevna potreba za vitaminom C i antioksidansima (Bebek Markovinović i sur., 2023). Ovaj rad bazira se na ispitivanju dobrobiti bioaktivnih molekula jagode, kao glavnog sastojka 3D ispisanog proizvoda "Jagodica Purgerica" (slika 1), i promociji funkcionalne hrane sa svrhom očuvanja zdravlja i prevencije kroničnih oboljenja (ZOV, 2022).



Slika 1. Funkcionalni 3D ispisani *snack* proizvod na bazi jagode, "Jagodica Purgerica" (prema ZOV, 2022)

2.2. JAGODA (*Fragaria ananassa* × Duch.)

Komercijalna vrsta jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.), hibridna je vrsta nastala prije 250 godina, križanjem dvije vrste, *Fragaria chiloensis* i *Fragaria virginiana* (Sangiovanni i sur., 2017). Jagoda, kao i 20 ostalih vrsta koje propadaju rodu *Fragaria*, pripadnik je porodice ruža (*Rosaceae*), porijekom iz regija Sjeverne polutke, iako se danas uzgajaju i rastu u cijelom svijetu. Većina država u kojima se tijekom povijesti uzgajala jagoda, razvile su svoje sorte, koje su najčešće prilagođene upravo uvjetima rasta u vidu klime, duljine dana, te nadmorske visine određenog područja. Jagoda se uspješno uzgaja na različitim vrstama tla, te zahtijeva vrlo malo gnojiva. Ipak, vrlo je podložna sušenju, te stoga zahtijeva vrstu tla koja zadržava vlagu ili adekvatan sustav navodnjavanja. Biljka raste i daje plodove u prosjeku od jedne do četiri godine.

Izgledom je jagoda biljka niskog rasta s razvijenim korijenskim sustavom, i obično tri lista, nazubljenih rubova sa sitnim dlačicama. Cvjetovi koji rastu na tankim stabljikama, koje izlaze iz pazušaca lišća su bijeli, a rijetko mogu biti i crveni (slika 2). Plod jagode je crven i može biti težak i do 30 grama (Britannica, 2022).



Slika 2. Cvjetovi i plodovi jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) (Britannica, 2022)

Jagoda se poradi svog nutritivnog i kemijskog sastava ubraja u funkcionalnu hranu. Prije svega, jagoda predstavlja vrijedan izvor vlakana, kao i fruktoze, što doprinosi regulaciji razine šećera u krvi, usporavajući probavu. Dijetetska vlakna također reguliraju i kontrolu unosa kalorija, obzirom da doprinose osjećaju sitosti. Jagode, u manjoj mjeri, predstavljaju izvor zdravih esencijalnih masnih kiselina, obzirom da je ulje iz sjemenki bogato nezasićenim masnim kiselinama, a također sadrži i karotenoide i tokoferole. Od vitamina koji nisu topljivi u mastima, najzastupljeniji je vitamin C. Upravo zbog toga jagode predstavljaju jedan od glavnih izvora vitamina C u ljudskoj prehrani. Vitamin B9, odnosno folat, koji je esencijalan za nastanak novih krvnih stanica, kao i održavanje funkcija stanica, pored vitamina C, je glavni mikronutrijent kojeg sadrži jagoda. Jagoda također predstavlja izvor i nekoliko drugih vitamina kao što su tiamin, niacin, vitamin B6, riboflavin, vitamin A i E. Jedno serviranje jagoda (oko 150 g), zadovoljava 20 % dnevne potrebe za manganom, kao i 5 % dnevne potrebe za kalijem (WebMD, 2023).

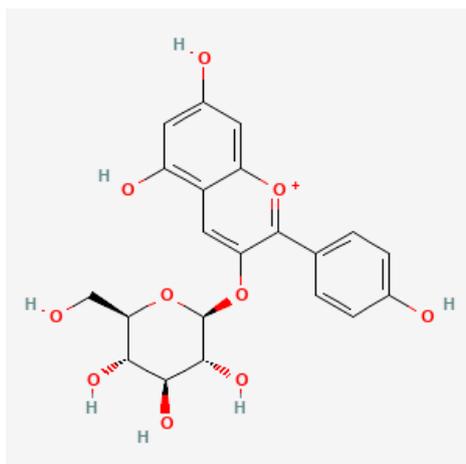
Pored nutritivnih spojeva, u sastavu jagode nalazi se i veliki broj različitih biološki aktivnih spojeva. Tu se ubrajaju različite vrste polifenola uključujući flavonoide, fenolne kiseline, lignane i tanine. Vitamini, minerali i antioksidansi koje sadrži jagoda imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, o čemu svjedoči veliki broj provedenih znanstvenih istraživanja i kliničkih studija. Dokazano je da redovna konzumacija jagoda može imati učinak na prevenciju i kontrolu oboljenja kao što su dijabetes tipa 2, kardiovaskularna oboljenja, rak, kao i zaštita kože. Polifenoli koje sadrži jagoda pokazali su se vrlo korisnim u povećanju osjetljivosti na inzulin kod zdravih individua, te na taj način direktno utječu na prevenciju dijabetesa (Giampieri i sur., 2012). Pored toga što se jagode ubrajaju u namirnice s niskim glikemijskim indeksom, te sadrže male količine šećera, mogu pomoći u metaboliziranju i drugih oblika

glukoze (WebMD, 2023). Redovna konzumacija jagoda sprečava i upalne procese, poboljšava funkciju endotela, sprečava stvaranje plakova u krvnim žilama, te povećava otpornost LDL (engl. *low density lipoprotein*) na oksidaciju. Mehanizam kojim jagode djeluju na smanjenje upale je mehanizmom hvatanja slobodnih radikala, obzirom da sadrže značajne količine vitamina C i polifenola kao što su antocijani (Giampieri i sur., 2012). Kao što je prethodno spomenuto, jagode imaju protuupalni učinak, te mogu sprječiti određena kožna oboljenja. Uz to protuupalni učinak jagode dokazan je i na drugim djelovima tijela, kao što su zglobovi, te se tako konzumacija jagode savjetuje i ljudima s konstantnim ili periodičnim osteoartritisom (WebMD, 2023.). Naposljetku, postoji veliki broj dokaza i o kemopreventivnom djelovanju jagoda, odnosno njenih vitamina (A, C, E), minerala, kao i polifenola. Otkriveno je nekoliko mehanizama djelovanja bioaktivnih komponenti jagode u prevenciji raka. Prvi je antioksidacijska aktivnost, koja se ogleda u uklanjanju reaktivnih kisikovih vrsta, smanjenju oštećenja DNA uzrokovanih oksidacijom, te poticanjem popravka DNA, kao i stimulacijom aktivnosti antioksidacijskih enzima. Drugi, nedavno istraženi mehanizam, je djelovanje fitokemikalija iz jagode na regulaciju staničnih procesa koji su vezani za razvijanje raka, kao što su apoptoza, stanica-stanica komunikacija, angiogeneza i stanična proliferacija te diferencijacija (Giampieri i sur., 2012).

2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI JAGODE

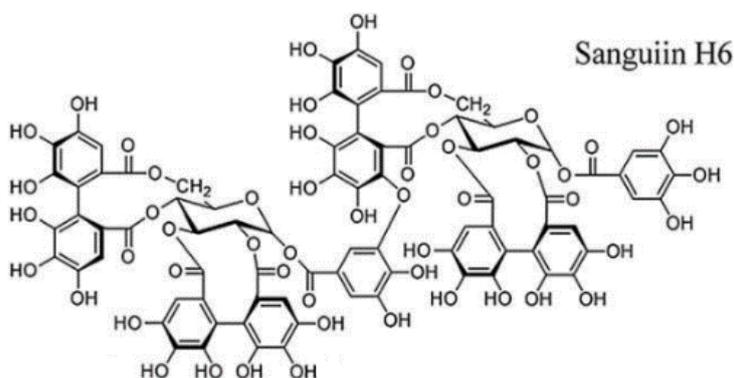
2.3.1. Polifenoli

Jagode predstavljaju visokovrijedan izvor različitih biološki aktivnih spojeva. Najzastupljeniji su polifenoli među kojima se ističu različite sastavnice flavonoida i fenolnih kiselina. Glavni predstavnici flavonoida, kao i najbolje istraženi polifenolni spojevi u jagodama su antocijani (Giampieri i sur., 2012). Iako je dokazano prisustvo oko 30 različitih kemijskih struktura antocijana, njih šest može se identificirati u voću. Pelargonidin 3-glukozid (slika 3) se nalazi se u najvećoj koncentraciji u jagodi (oko 95% ukupnih antocijana jagode). Prema zastupljenosti, slijedi ga cijanidin 3-glukozid (3-4 % ukupnih antocijana jagode). Ovisno o sortimentu jagode, mogu biti zastupljeni još i peonidin ili petunidin. Glukoza i rutinoza su najčešći šećeri u sastavu antocijana jagode, dok se u manjem broju nalaze arabinoza i ramnoza (Lopes da Silva i sur., 2007).



Slika 3. Kemijska struktura pelargonidin 3-glukozida (prema PubChem, 2023)

Druga velika podskupina flavonoida u jagodama su elagitanini. Elagitanini su hidrolizirani tanini koji predstavljaju spoj galne kiseline i heksahidroksidifenske kiseline s glukozom. Mogu biti monomeri (glikozidi elaginske kiseline), oligomeri (sanguiin H-6) ili kompleksni polimeri (Chunyang i sur., 2020). Elagitanin koji se u jagodama nalazi u najvećoj koncentraciji je sanguiin H-6 (slika 4). Neki od ostalih bitnih elagitanina jagode su agrimoiin, koji se posebice nalazi u velikoj koncentraciji kod šumske jagode (*Fragaria vesca*), te lambertianin C (Vrhovsek i sur., 2012).



Slika 4. Kemijska struktura sanguina H-6 (prema Giampieri i sur., 2012)

Pored antocijana i elagitanina koji se nalaze u najvećim koncentracijama, jagoda sadrži i ostale flavonoidne strukture poput kvercetina i kempferola, uglavnom prisutni kao monomerni ili polimerni oblici koji se nazivaju tanini ili procijanidini. Procijanidini ovisno o fiziološkoj aktivnosti pokazuju antioksidacijsko, antimikrobno, antialergeno ili antihipertenzivno svojstvo. Od fenolnih kiselina u jagodama, pronađeni su derivati

hidroksibenzojevih kiselina, te u manjoj mjeri derivati hidroksicimetnih kiselina (Giampieri i sur., 2012).

Rezultati kliničkih studija su pokazali da redovna konzumacija jagoda dovodi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta krvne plazme, te smanjenja nivoa masnoća u krvi. Upravo polifenoli iz jagode nose glavnu zaslugu za opisane učinke (Forbes-Hernandez i sur., 2015). Također, polifenoli iz jagode inhibiraju stvaranje slobodnih radikala, moduliraju ekspresiju gena koji su uključeni u stanično preživljavanje, proliferaciju i antioksidativnu zaštitu, te potiču popravak DNA nakon oštećenja (Giampieri i sur., 2015).

2.4. REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES

Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) predstavljaju veliki broj različitih reaktivnih molekula i slobodnih radikala koji su derivati molekularnog kisika (Sies i Jones, 2020). Većina reaktivnih kisikovih vrsta nastaje kao produkt aerobnog načina života, točnije tijekom aerobne respiracije u prijenosu elektrona u mitohondrijama. ROS-ovi također nastaju kao intermedijeri reakcija oksidacije koje kataliziraju metali. Kisik u molekularnom obliku ima dva nesparena elektrona u posljednjoj, valentnoj elektronskoj ljusci, što ga čini vrlo povoljnim za stvaranje radikala. Primanjem elektrona, odnosno postupnom redukcijom kisika nastaje veliki broj ROS-ova. Neki od glavnih su superoksid (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), vodikov radikal ($OH\cdot$), te dušikov oksid ($NO\cdot$) (BioTek, 2021). Pored enzimskih reakcija, reaktivne kisikove vrste mogu nastati i kao produkti neenzimskih reakcija u reakcijama kisika s određenim organskim spojevima ili izlaganjem stanica radijaciji. Slobodni radikali prema uzroku nastanka mogu biti endogenog i egzogenog porijekla. Aktivacija stanica imunološkog odgovora, infekcija, rak, upala, stres i starenje, neki su od procesa odgovornih za endogeni nastanak slobodnih radikala. Egzogeni uzroci nastanka slobodnih radikala su izlaganje okolišnom zagađenju, određenim lijekovima, kemijskim otapalima, nikotinu, teškim metalima ili alkoholu (Pizzino i sur., 2017).

Reaktivne kisikove vrste imaju bitnu ulogu u pravilnom funkcioniranju organizma. Tako, kada se njihova koncentracija održava niskom u organizmu, reaktivne kisikove vrste sudjeluju u sintezi određenih staničnih struktura te služe u zaštiti organizma od patogena. Slobodni radikali su također uključeni u molekularne puteve stanične signalizacije. Najpoznatija signalna molekula u stanicama, koja je ujedno i slobodni radikal, je dušikov oksid (NO). Dušikov oksid je važan glasnik u komunikaciji stanica-stanica, uključen je u nespecifični imunski odgovor te je ključan za normalnu neuralnu aktivnost, kao i održavanje pravilnog

krvotoka. Naposljetku, slobodni radikali, također reguliraju procese proteinske fosforilacije, aktivacije transkripcijskih faktora, apoptoze, i stanične diferencijacije (Pizzino i sur., 2017).

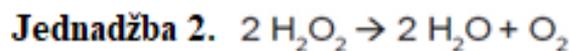
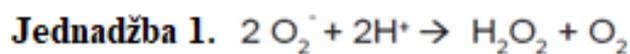
Međutim, kada koncentracija ROS-ova u tijelu poraste, dolazi do stvaranje oksidativnog stresa, koji negativno utječe na stanične strukture uključujući membrane, lipide, proteine, lipoproteine i deoksiribonukleinske kiseline. Oksidativni stres između ostalog doprinosi oboljevanju od raka, dijabetesa, ateroskleroze te kardiovaskularnih oboljenja. Oksidativni stres djeluje čak i na DNA organizma, a najpoznatija lezija DNA koja se događa kao posljedica oksidativnog stres je 8-okso-2'-deoksigvanozin (8-OdG) (Pizzino i sur., 2017).

2.4.1. Antioksidansi

Kad dođe do neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanica da ih ukloni, nastaje oksidativni stres, koji može imati negativne učinke kako na stanice i stanične strukture, tako i na cijeli organizam. Stoga je detoksifikacija reaktivnih kisikovih vrsta ključna za preživljenje svih aerobnih organizama. Antioksidansi, prema najjednostavnijoj definiciji, predstavljaju tvari ili enzime koji uklanjaju reaktivne kisikove vrste iz organizma. Osnovno zajedničko svojstvo svim antioksidansima je mogućnost da djeluju kao donori elektrona. Također je bitno napomenuti da određeni spojevi mogu djelovati kao donori elektrona, ali i primatelji (Harvard, 2023).

Istraživanja i otkriće antioksidansa započelo je tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća kad su znanstvenici počeli otkrivati negativne učinke reaktivnih kisikovih vrsta i oksidativnog stresa. Tako je napravljena poveznica između smanjenog unosa hrane kao što su voće i povrće, koji obiluju antioksidansima i oboljenja uzrokovanih oksidativnim stresom. U skladu s tim, napravljena su brojna klinička ispitivanja gdje je testiran učinak određenih spojeva koji su smatrani dobrim antioksidansima, na ljudima s kroničnim oboljenjima, gdje se uvidjelo da antioksidansi imaju pozitivan učinak i djeluju terapijski (Harvard, 2023).

Inaktivacija slobodnih radikala u stanici odvija se različitim mehanizmima. Najbolje poznat mehanizam je mehanizam djelovanja enzima superoksid dismutaze (SOD) (slika 5, jednadžba 1). Drugi mehanizam je mehanizam djelovanja enzima katalaze koji u peroksisomima eukariotskih stanica katalizira konverziju vodikovog peroksida do vode i kisika (slika 5, jednadžba 2), te na taj način završava inaktivaciju započetu djelovanjem enzima superoksid dismutaze (BioTek, 2021).



Slika 5. Reakcije detoksifikacije slobodnih radikala koje kataliziraju enzimi superoksid dismutaza (jednadžba 1) i katalaza (jednadžba 2) (prema BioTek, 2021)

Još jedan od enzima koji sudjeluje u detoksifikaciji slobodnih radikala je glutathion peroksidaza koji katalizira razgradnju vodikovog i drugih organskih peroksida do alkohola. Pored enzimskih, postoji i nekoliko neenzimskih molekula koje uklanjaju ROS-ove. Najpoznatija takva molekula je glutathion, tripeptid koji svojom istaknutom sulfhidrilnom skupinom služi kao meta za oksidaciju sa ROS-ovima. Tako, omjer oksidiranog oblika (GSSG) i reduciranog oblika glutathiona (GSH) predstavlja indikator oksidativnog stresa u organizmu (BioTek, 2021).

Vitamini kao što su vitamin C, vitamin E, i karotenoidi (beta-karoten, likopen, lutein), pokazali su značajne uloge u detoksifikaciji slobodnih radikala. Također, minerali ubrajajući selen, mangan i magnezij pokazuju dobra antioksidacijska svojstva (NIH, 2013). Mnogi drugi metaboliti, kao što su urična kiselina, bilirubin i melatonin imaju antioksidacijsku funkciju u organizmu. Urična kiselina se čak smatra glavnim antioksidansom koji štiti centralni živčani sustav (CNS) od slobodnih radikala (He i sur., 2017). Naposljetku, bitni spojevi, kada se govori o biljnim izvorima antioksidansa jesu polifenoli. Naime, polifenoli, koji se nalaze u visokim koncentracijama u voću kao što su jagoda i drugo jagodasto voće, imaju idealnu kemijsku strukturu za neutralizaciju slobodnih radikala, te se stoga u velikoj mjeri promovira konzumacija ovog voća kao vrijednih prirodnih izvora antioksidanasa (Blokhina i sur., 2003).

2.4.2. Prooksidansi

Prooksidansi se definiraju kao kemikalije koje uzrokuju oksidativni stres, i to na dva načina. Prvi mehanizam kojim prooksidansi uzrokuju oksidativni stres je stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta, dok drugi podrazumijeva inhibiciju djelovanja antioksidanasa. U prooksidanse se ubraja veliki broj spojeva, te se oni mogu podijeliti u nekoliko kategorija uključujući lijekove, metale, pesticide, zagađivače zraka i vode, te ionizirajuće i neionizirajuće zračenje (Sotler i sur., 2019). Bitno je naglasiti da ovisno o uvjetima, i njihovoj koncentraciji, određeni spojevi mogu djelovati i kao antioksidansi i prooksidansi (Bionity, 2023.).

Počinjući od prve kategorije prooksidansa, lijekovi kao što su analgetici ili antikancerogeni agensi, mogu izmjeniti makromolekule i stvarati reaktivne kisikove vrste, koji stvaraju oksidativni stres. Oksidativni stres generiran od strane lijekova, najveći utjecaj ima na funkciju bubrega i jetre. Nadalje, metali kao što su mangan, željezo, i bakar također mogu djelovati kao prooksidansi. Ovi metali dovode do prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, putem Fentonove i Haber-Weiss reakcije (Sotler i sur., 2019). Kronični manganizam je bolest uzrokovana oksidativnim stresom potaknutim visokim koncentracijama mangana, dok je hemokromatoza bolest uzrokovana oksidativnim stresom koji nastaje kao posljedica povišene razine željeza u organizmu. Wilsonova bolest, povezana je sa povišenom razinom bakra u organizmu, čiji simptomi uključuju jednu vrstu psihoze, dijabetes, artritis i fibrozu (Bionity, 2023). Pesticidi, predstavljaju još jednu kategoriju prooksidansa. Oni, s DDT-om (diklordifeniltrikloretan) kao najpoznatijim predstavnikom, stimuliraju nastanak reaktivnih kisikovih vrsta, peroksidaciju lipida, te inhibiraju antioksidativnu aktivnost enzima i glutationa (Sotler i sur., 2019).

Spojevi koji djeluju kao antioksidansi, kad su prisutni u određenim koncentracijama mogu djelovati i kao prooksidansi. Jedan od spojeva koji se smatra izuzetno jakim antioksidansom, a može imati i prooksidativno djelovanje je vitamin C. Prooksidativno djelovanje vitamina C iskazuje se kad se on kombinira sa željezom ili bakrom, te dovodi do redukcije istih ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$; $\text{Cu}^{3+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$), što onda dovodi do redukcije vodikovog peroksida do vodikovog radikala. Karoteonidi, koji se također smatraju potentnim antioksidansima, dokazano mogu djelovati i kao prooksidansi. Njihovo prooksidativno djelovanje ogleda se kroz autooksidaciju, do koje dolazi u prisutnosti viših koncentracija vodikovih radikala. Flavonoidi pored antioksidativnih imaju i prooksidativna svojstva, te tako u prisutnosti metala, dovode do lipidne peroksidacije i oštećenja DNA. Naposljetku, polifenoli koji dolaze iz prehrane, mogu djelovati kao prooksidansi kada se nađu u blizini redoks-aktivnih metala (željezo i bakar), te tada uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, koji oštećuju DNA i ostale stanične makromolekule (Burton i Traber, 1990).

2.4.3. Oštećenja DNA

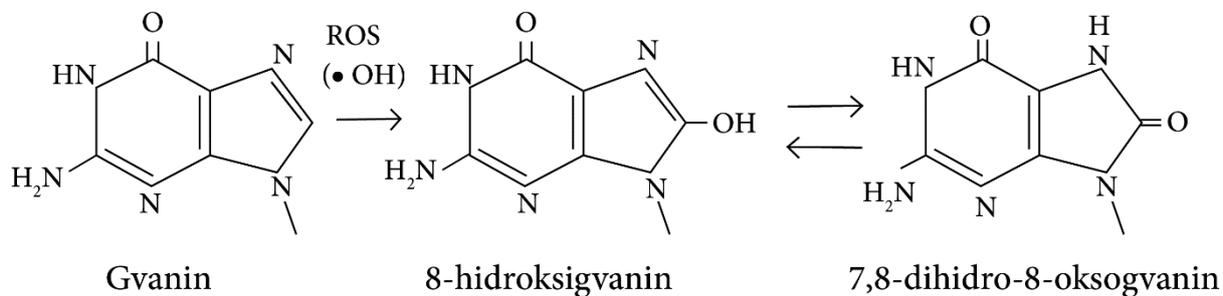
Svakog dana se unutar DNA jedne humane stanice, dogodi u prosjeku od nekoliko tisuća do million događaja koji dovode do njenog oštećenja. DNA oštećenje se definira kao bilo koja modifikacija DNA koja dovodi do promjene njenih kodirajućih svojstava ili ometa normalno odvijanje transkripcije i replikacije. Postoji više vrsta oštećenja DNA od kojih

najčešća uključuju apurinska/apirimidinska mjesta (abazična mjesta), jednolančane lomove, dvolančane lomove, DNA-protein interakcije, te insercije i delecije (Lee, 2008).

Kada se govori o oštećenjima DNA, bitno je napraviti distinkciju između oštećenja i mutacije DNA. Stanica većinu oštećenja koja se dogode u DNA može popraviti. Ona oštećenja DNA koja stanice ne može popraviti, te se ona nakupljaju, mogu rezultirati mutacijom. Odnosno, svaka mutacija jeste DNA oštećenje, ali svako DNA oštećenje nije mutacija (Greenberg, 1999). DNA oštećenja, tako, uzrokujući mutacije, sudjeluju u patogenezi mnogih neuroloških oboljenja kao što je Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, cerebralna ishemija, amiotrofna lateralna skleroza, kao i u razvoju raka, jedne od najzastupljenijih bolesti današnjice (Lee, 2008).

Oštećenja DNA mogu biti uzorkovana endogenim (metaboličkim) ili eksternim (okolišnim) procesima. Eksterni uzroci oštećenja DNA su fizikalni i kemijski mutageni. Fizikalni mutageni ubrajaju UV zračenje, te ionizirajuće zračenje (X-zrake). Izlaganje stanica zračenju dovodi do nastanka slobodnih radikala unutar stanice koji stvaraju reaktivne kisikove vrste (ROS), što na kraju rezultira oštećenjima DNA kao što je jednolančani ili dvolančani lom. Kemijski mutageni djeluju tako da na DNA baze kovalentno vežu alkilne skupine i uzrokuju oštećenja. Oštećenja DNA, kao što je spomenuto, mogu biti i rezultat endogenih metaboličkih i biokemijskih reakcija koje se odvijaju unutar samog organizma ili stanice. Neke od takvih reakcija ubrajaju hidrolizu. Tijekom ovog procesa dolazi do odvajanja purinske nukleotidne baze (adenin ili gvanin) iz jednog od lanaca DNA, i oštećenja DNA koje se naziva depurinacija. S druge strane, gubitkom amino skupine unutar adenina, gvanina ili citozina, dovodi do još jednog oštećenja DNA koje se naziva deaminacija. Metilacija DNA, koja se u stanici događa djelovanjem metaboličkog intermedijera S-adenozil metionina, koji metilira citozin na 5.-om C-atomu citozinskog prstena, predstavlja još jedno oštećenje DNA. Normalni metabolički procesi, kako je prethodno elaborirano (poglavlje 2.4.), dovode do nastanka reaktivnih kisikovih vrsta, koji mogu oksidirati i purinske i pirimidinske baze unutar strukture DNA. Najčešća mutacija koja se događa kao posljedica oksidacije ROS-ovima je oksidacija gvanina do 8-okso-7,8-dihidrogvanina, koji rezultira nukleotidom 8-okso-deoksigvanozin (8-okso-dG) (slika 6). 8-okso-dG se onda tijekom procesa replikacije ne sparuje sa deoksicitidinom kao što je očekivano, nego sa deoksiadeninom, te ako se ova greška ne popravi, replicirana DNA će sadržavati C → A mutaciju, odnosno transverziju. Oksidativni stres, odnosno ROS-ovi mogu uzrokovati i druga oštećenja DNA kao što je depirimidinizacija, kao i jednolančani i dvolančani

lom. Naposljetku, oštećenja DNA događaju se i tijekom replikacije, točnije u S fazi staničnog ciklusa, a to su najčešće jednolančani i dvolančani lomovi (SigmaAldrich, 2023).



Slika 6. Oksidacija gvanina djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (prema Hirano i Tamae, 2010)

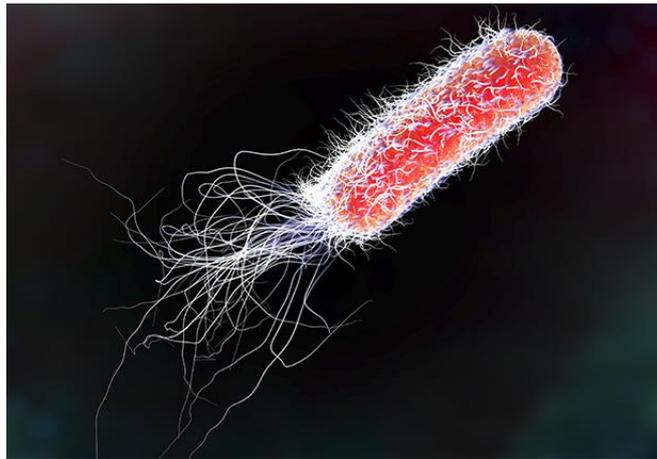
2.5. PREDSTAVNICI MIKROBIOTE (PATOGENI KARAKTER/ NORMALNA MIKROFLORA)

2.5.1. *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* predstavlja Gram-negativnu bakteriju, oblika štapića koja pripada porodici enterobakterija (*Enterobacteriaceae*) (slika 7). Enterobakterije, koje ubrajaju više rodova bakterija uključujući rodove *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella* i *Erwinia*, predstavljaju normalnu crijevnu mikrofloru kod ljudi i životinja. Karakteristika svih enterobakterija je da su fakultativni anaerobi, točnije da mogu rasti bez kisika, ali ga mogu i koristiti kada je dostupan, te rastu na glukozi. Pored toga što su normalni stanovnici crijevne mikroflore, enterobakterije također predstavljaju jedne od najčešćih patogena koji uzrokuju mnogobrojne infekcije kod ljudske populacije. Tako, se namirnice u kojima se dokaže prisustvo eneterobakterije smatraju higijenski neispravnim te se ne mogu konzumirati (Goldman i Schafer, 2020).

Bakterija *Escherichia coli* je prema mjestu koja naseljava izuzetno raznolika vrsta, te je adaptibilna na različite okoliše. Ipak, ona kod čovjeka boravi kao komenzal u probavnom traktu, točnije crijevima i urinarnom traktu (Cleveland Clinic, 2023). Naime, *E. coli* kolonizira ljudski probavni trakt već 40 sati po rođenju, vezanjem za crijevnu sluznicu. Obzirom da nastanjuje crijeva čovjeka te da se identifikira u fecesu, bakterija *E. coli* također služi kao indikator fekalne kontaminacije, odnosno zagađenja vode i hrane (Jang i sur., 2017).

Neki sojevi *E. coli* ipak mogu biti patogeni te uzrokovati različite vrste probavnih problema kao što je dijareja, bol i grčevi u stomaku kao i temperatura, ali i upale urinarnog trakta pa čak i pneuomoniju (WebMD, 2022). Uslijed specifičnih promjena u genetičkom materijalu, patogeni sojevi *E. coli* mogu nositi nekoliko faktora virulencije koji su uključeni u patogenezu bakterije kod čovjeka. Virulencijski faktori kod *E. coli* su adhezini, toksini i polisaharidne kapsule koji se eksprimiraju ovisno o okolišnim uvjetima, te omogućuju da bakterija *E. coli* preživi izvan probavnog sustava i uzrokuje bolest (Jang i sur., 2017).



Slika 7. *Escherichia coli* (prema Biolabtests, 2022)

2.5.2. *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum je Gram-pozitivna bakterija, oblika štapića, koja pripada rodu *Lactobacillus* (slika 8). Rod *Lactobacillus* jedan je od rodova koji se svrstavaju u skupinu bakterija mliječne kiseline, koje predstavljaju najpoznatije prirodne probiotike te imaju izuzetno bitnu ulogu u očuvanju zdravlja kod ljudi. Bakterije mliječne kiseline štite organizam od patogenih mikroorganizama, štite imunološki sustav te poboljšavaju probavu (Nagmouchi i sur., 2019).

L. fermentum je nesporogena bakterija koja nema mogućnost kretanja. Obzirom da može fermentirati, odnosno za rast koristiti veliki broj šećera, *L. fermentum* preživljava u vrlo raznolikim okolišima kako kod ljudi tako i životinja. No, ipak, njeno glavno stanište su ljudski želudac i probavni trakt. Ova bakterija proizvodi lizozim, plin iz glukoze, kao i amonijak iz arginina (Calasso i Gobetti, 2011). Bakterija *L. fermentum* proizvodi također različite antimikrobne peptide, koji se mogu koristiti kao alternativa antibioticima obzirom da oni inhibiraju rast crijevnih patogena, ili kao konzervansi za prehrambene proizvode. Nadalje, probiotički sojevi *L. fermentum*, kako su različita klinička ispitivanja pokazala, imaju i svojstvo

smanjenja razine kolesterola u krvi. Naposljetku, bakterija *L. fermentum* se koristi kao bitna bakterijska vrsta i u prehrambenoj industriji. Bakterija *L. fermentum* posebnu uporabu nalazi u tehnologiji proizvodnje kiselog tijesta, pridonoseći ukusu, teksturi kao i nutritivnim vrijednostima sastojaka tijesta. Također, u posljednje vrijeme *L. fermentum* se koristi i u razvoju novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda obogađenih probiotičkim kulturama, koji imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi (UC DAVIS, 2018).



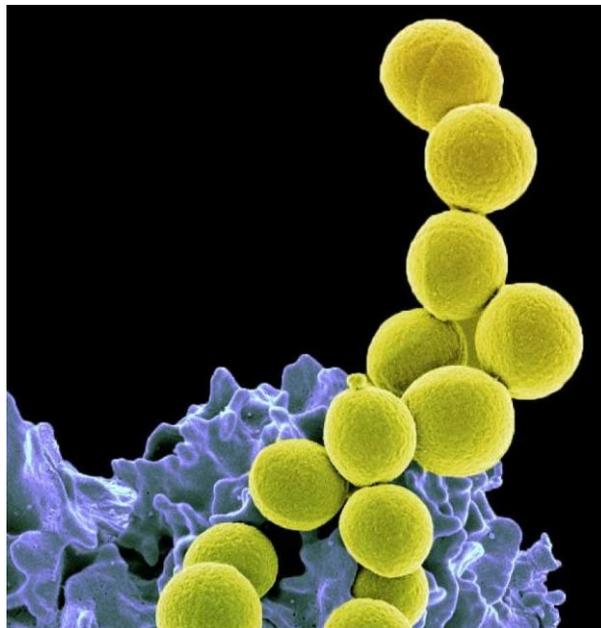
Slika 8. *Lactobacillus fermentum* (prema Microbz, 2023)

2.5.3. *Staphylococcus aureus*

Bakterija *Staphylococcus aureus* je jedna od glavnih humanih patogena, uzročnika brojnih oboljenja. *S. aureus* je uzročnik kako bolničkih tako i drugdje stečenih infekcija, te je liječenje od istih vrlo zahtjevno zbog pojave MRS-e, odnosno *Staphylococcus aureus* koji je rezistentan na antibiotik meticilin (MN, 2022).

S. aureus je prema izgledu Gram-pozitivna bakterija oblika koka, te se najčešće organizira u grozdove (slika 9). Kolonije bakterije *S. aureus* su prepoznatljive žute ili zlatne boje, te može rasti aerobno, ali i u odsustvu kisika. Najpogodniji šećerni alkohol na kojem *S. aureus* raste i razmnožava se je manitol. Bakterija *S. aureus* se može naći u okolišu, ali i kao dio normalne humane flore kože i sluznice. Kada se nalazi u normalnim koncentracijama, *S. aureus* ne uzrokuje infekcije na koži. Međutim ulaskom u krvotok i tkiva unutarnjih organa, *S. aureus* može izazvati vrlo ozbiljne infekcije. Jedno od oboljenja uzrokovanih infekcijom bakterijom *S. aureus* je endokarditis, infekcija unutarnje membrane srca. Nadalje, bakterija *S. aureus* uzrokuje bakteremiju, odnosno infekciju krvotoka, zatim trovanje hranom, septički artritis, te toksični šok sindrom, koji je rezultat djelovanja toksina koje proizvode određeni

sojevi *S. aureus*. Naposljetku, *S. aureus* uzrokuje brojne kožne bolesti kao što su različite vrste osipa, čireva, i celulitis (Mayo Clinic, 2022). Liječenje ovih infekcija uključuje antibiotike. Međutim, kako je spomenuto, postoje sojevi bakterije *S. aureus* koji su postali rezistentni na većinu antibiotika koji su u javnoj uporabi. Najpoznatiji soj *S. aureus* koji je rezistentan na antibiotike je MRSA. Soj MRSA nosi gen *mec* koji je dio veće kromosomske kazete (SCCmec) koja nosi rezistenciju za veći broj antibiotika, uključujući meticilin, nafcilin, oksacilin i cefalosporine. *Mec* gen kodira za PBP-2A (penicilin vezujući protein 2A), protein koji je ključan za sintezu peptidoglikana u bakterijskom staničnom zidu. PBP-2A ima manji afinitet vezanja za penicilinske antibiotike, te se stoga sinteza bakterijskog staničnog zida nastavlja odvijati i u prisustvu antibiotika, pa sojevi *S. aureus* koji sintetiziraju PBP-2A rastu i u prisustvu antibiotika (Lowy, 1998).



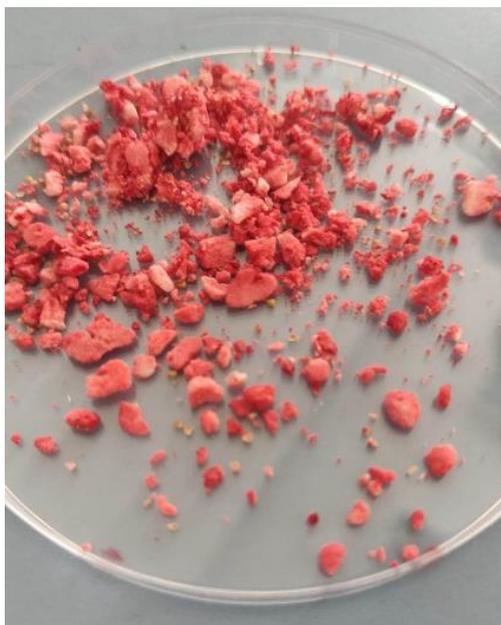
Slika 9. Metilicin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (prema NIH, 2023)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Kaša jagode (*Fragaria ananassa* × Duch., cv. 'Albion') je dobivena homogenizacijom štapnim mikserom unaprijed odmrznutih plodova. U kaši je potom spektrofotometrijski određen bioaktivni sastav. Preostali dio plodova jagode sterilnim je skalpelom narezan na tanke ploške (debljine do 2 mm) i podvrgnut postupku liofilizacije, usitnjavanja u tarioniku, te je u obliku finog praha korišten za daljnje eksperimente (slika 10).



Slika 10. Liofilizirana kaša jagode (*vlastita fotografija*)

3.1.2. Biološki test sustavi

3.1.2.1. *Humane stanične linije*

Kako bi se provela karakterizacija ekstrakta jagode, upotrijebljene su četiri vrste humanih staničnih linija, stanice adenokarcinoma epitela želuca AGS (ACCC), stanice adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 (donacija Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada), stanice pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, te HepG2 (donacija Instituta Ruđer Bošković) stanice hepatocelularnog karcinoma jetre. Odabrane su upravo ove stanične linije kako bi se napravila simulacija probavnog sustava čovjeka, te na taj način dobili što vjerodostojniji rezultati utjecaja ekstrakta jagode na zdravlje ljudi. Stanične kulture su rasle u T-bocama u potpunom hranjivom mediju, Ham's F-12, te se vodilo računa da stanice rastu

u monosloju do konfluentnosti. Uzgoj stanica je proveden u inkubatoru, pri kontroliranoj temperaturi (37 °C), i atmosferi (CO₂ (5 %)).

3.1.2.2. Modelni sustav DNA

U ovom radu je kao modelna makromolekula upotrijebljen superzavijeni plazmid phiX174 RF1 DNA. Inače, ovaj plazmid se vrlo često koristi za istraživanje nikazne aktivnosti restriktivskih enzima. phiX174 je prvi DNA virus koji je otkriven da ima jednolančani cirkularni genom, duljine 5386 nt. Superzavijena dvolančana forma plazmida dobivena je na temelju jednolančane DNA prisutne u virusu. Naime, DNA pakirana u virion je označena kao „+“ lanac, koji kada uđe u stanicu služi kao kalup za sintezu „-“ lanca (Thermo Fisher, 2022). Princip djelovanja plazmida kao modelnog sustava je da se uslijed oksidacijskog oštećenja DNA, plazmid relaksira, te se kao takav sporije kreće u agaroznom gelu, u odnosu na superzavijenu formu.

3.1.2.3. Mikroorganizmi

Za potrebe ovog rada, pored humanih korištene su i bakterijske stanice. Bakterije koje su korištene su: *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*. Ove bakterijske vrste pripadaju zbirci organizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Oni se čuvaju na -80 °C u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi sa dodatkom 10 %-tnog glicerola. Kada se bakterijske stanice žele upotrijebiti za izvedbu određenog eksperimenta, zamrznuti alikvoti bakterijskih kultura se inokuliraju u odgovarajuću tekuću hranjivu podlogu, točnije *Escherichia coli* naciepljena je u M9-minimalnu podlogu, *Staphylococcus aureus* u LB podlogu, dok je *Lactobacillus fermentum* naciepljen u MRS podlogu. Inkubacija se odvija preko noći pri optimalnoj temperaturi rasta.

3.1.3. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, ABJ220-4NM, *Kern&Sohn GmbH*, Balingen, Njemačka
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu, Microspin 12, *BIOSAN SIA*, Latvija
- Centrifuga, *Thermo Scientific™*, *Megafuge™* 16R, Kalkberg, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih ploča, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Inkubator - *Brouwer AGSA CH-Luzern MODEL 35-48*, Water-Jacketed incubator, Švicarska
- Laminar za sterilan rad sa staničnim kulturama, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- Svjetlosni mikroskop, XDS-1, *Optika Microscopes*, Italija

- Spektrofotometar, *LLG-uniSpec 2*, Meckenheim, Njemačka
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD
- Sonifikator
- Ultrazvučna kupelj, DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5L, 860W, 40 kHz, *Bandelin electronic*, Njemačka

3.1.4. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Bürker-Türkova komorica
- Erlenmeyerove tikvice (volumeni od 20 do 1000 mL)
- Filter papir
- Staklene kivete (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske staklene čaše
- Laboratorijske žlice
- Marker
- Menzure (volumena od 50 do 1000 mL)
- Mikropipete od 20, 200 i 1000 μ L, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Nastavci za mikropipete (20, 200, i 1000 μ L)
- Tikvice za mjerenje različitih volumena (25-100 mL)
- Pamučna vata
- Plastične falkonice (50 mL)
- Pokrovna stakalca
- Petrijeve zdjelice, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Kapaljka, staklena
- Staklene epruvete, 10 mL
- Stakleni lijevak
- Staklene pipete (1, 2, 5, 10, 20, 25 mL)
- Špatula, metalna
- Štapni mikser
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin Lakes, SAD

3.1.5. Kemikalije

- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Agar, *Biolife*, Italija
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Lonza*, Rockland, SAD
- Bakto-tripton, *Biolife*, Italija
- Bromtimol plavo, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etanol, *Lach-ner, s.r.o.*, Republika Češka
- Etidij bromid, *Sigma Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Ekstrakt jagode
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Ledena octena kiselina (80 % (v/v)), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- MRS Broth, *Biolife*, Italija
- Mili-q-voda $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$
- Natrijev klorid, *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Glicerol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev klorid, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, *Riedel-de Haën AG Seelze*, Hannover, Njemačka
- Kvašček ekstrakt, *Biolife*, Italija
- Plazmid PhiX174 RF1 DNA, *Promega, Modisco*, SAD
- Tripsin, *Capricorn Scientific*, Njemačka
- Vodikov peroksid, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

3.1.5.1. Otopine

1. Otopine upotrijebljene za provođenje testa citotoksičnosti ekstrakta jagode

- PBS- fosfatni pufer (pH = 7,2-7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	1,16 g
K_2HPO_4	0,2 g

Demineralizirana voda 1000 mL

Fosfatni pufer se autoklavira 20 minuta, pri temperaturi od 120 °C i tlaku od $1,01 \times 10^5$ Pa.

➤ Otopina Neutral red-a, 5 mg/mL (ishodišna)

Neutral red 50 mg

Etanol 10 mL

➤ Otopina Neutral red-a (radna)

Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL⁻¹ 0,1 mL

RPMI 1640 hranjivi medij 9,9 mL

➤ Otopina za odbojavanje

Demineralizirana voda 100 mL (50 %)

Etanol 98 mL (49 %)

Ledena octena kiselina 2 mL (1 %)

2. Otopine upotrijebljene za određivanje ROS-ova (reaktivnih kisikovih radikala)

➤ Otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 2 mM (ishodišna)

DCFH-DA 1,5 mg

DMSO 1,5 mL

➤ Otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 50 μM (radna)

Ishodišna otopina DCFH-DA, 2 mM 0,25 mL

PBS pufer (pH = 7,2 – 7,4) 9,75 mL

3. Otopine upotrijebljene za testiranje protektivnog i genotoksičnog učinka ekstrakta jagode na modelnoj DNA molekuli

➤ TAE pufer, 10x

Tris-HCl 48,4 g

Ledena octena kiselina	11,4 mL
EDTA	3,7 g
Demineralizirana voda	do 1000 mL

➤ TE pufer, 10x

EDTA	2,92 g
TRIS	15,75 g
Demineralizirana voda	do 1000 mL

➤ Agarozni gel (1 %)

Agaroz	1,5 g
TAE pufer, 1x	150 mL

➤ Pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel (engl. *loading buffer*)

Bromtimol plavo	0,2 g
Glicerol, 50 %	6 mL
Demineralizirana voda	4 mL

➤ Otopina etidij bromida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) (radna)

Ishodišna otopina etidij bromida, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$	37,5 μL
Demineralizirana voda	do 750 mL

3.1.5.2. Hranjive podloge

Kako bi se testirala citotoksičnost ekstrakta jagode na bakterijske sojeve, upotrijebljivane su tri vrste hranjivih podloga. Za kultivaciju *Escherichia coli*, korištena je M9-minimalna hranjiva podloga sa dodatkom laktoze, za kultivaciju *Lactobacillus fermentum* korištena je MRS (engl. *Man, Rogosa and Sharpe*) hranjiva podloga, te je za kultivaciju bakterije *Staphylococcus aureus* upotrijebljivana LB (engl. *Luria-Bertani*) hranjiva podloga. LB i MRS su kompletne hranjive podloge, dok je M9 selektivna hranjiva podloga. Sastav hranjivih podloga naveden je u tablicama 1, 2 i 3. Sve podloge su prije uporabe sterilizirane pri temperaturi od $121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku $1,01 \times 10^5 \text{ Pa}$.

Tablica 1. Sastav M9- minimalne hranjive podloge sa laktozom

SASTOJAK	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
AGAR	15g
Destilirana voda	1000 mL
*1 M MgSO ₄	2 mL
*1 M CaCl ₂	100 µL
*20% laktoza	10 mL
*Tiamin (2 mg mL ⁻¹)	1 mL

U tablici 1. prikazan je sastav M9-minimalne podloge sa laktozom. Bitno je napomenuti da kada se svi sastojci označeni sa * sjedine, potrebno ih je sterilizirati. Sterilizacija se provodi tijekom 15 minuta, pri temperaturi od 130 °C i tlaku od 1,01x 10⁵ Pa. Nakon sterilizacije se dodaju sastojci koji nisu označeni zvjezdicom.

Tablica 2. Sastav MRS hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
MRS Broth	55,2 g
AGAR	9g
Destilirana voda	1000 mL

Tablica 3. Sastav LB hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1000 mL

3.1.6. Programi za obradu podataka

- JASP 0.10.02 - program za statističku obradu podataka
- Gel analyzer – program za obradu gelova dobivenih elektroforezom
- Microsoft excel 2016

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija jagode

Kako bi se odredio polifenolni sastav jagode, provedena je ekstrakcija prethodno pripremljene kaše jagode (3.1.1.). Odvažuje se 5 g uzorka kaše jagode u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom od 50 mL te se nadoda 40 mL destilirane vode. Tako pripremljena smjesa se ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji pri $T=50\text{ °C}$ i $t=15\text{ min}$. Po provedenoj ekstrakciji, uzorci se filtriraju u odmjerne tikvice volumena 50 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake (Bursać Kovačević i sur., 2016).

3.2.2. Određivanje bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta jagode

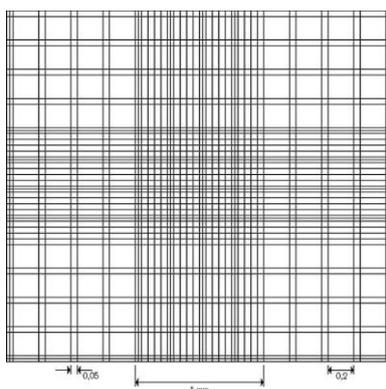
Određivanje ukupnih fenola provodi se u vodenom ekstraktu uzorka primjenom modifikacije spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018). Ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavonoli određivani su prema metodi iz literature pri čemu se reakcijskoj smjesi mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003). Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorpcija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC, 1990). Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun et al., 1998). Detaljan opis svih ovih analiza dan je u literaturi (Bebek Markovinović i sur., 2022a; Bebek Markovinović i sur., 2022b).

3.2.3. Uzgoj stanica za određivanje citotoksičnog i oksidativnog učinka

Kao što je prethodno navedeno u poglavlju materijala (3.1.2.1.), kultivacija humanih staničnih linija (AGS, CaCo-2, Cal27, i HepG2) provodila se u potpunom Ham's F-12 hranjivom mediju u T-bocama, u inkubatoru, u uvjetima temperature 37 °C, te 5 % CO₂ i 95 % zraka. Kako bi se stanice održavale u eksponencijalnoj fazi rasta, povremeno se stari medij mjenjao novim i svježim. Stanice su uzgajane do konfletnosti.

3.2.4. Priprema i utvrđivanje koncentracije stanica

Nakon što su stanice narasle do konfluentnosti, iz T-boca je uklonjen medij. Stanice su potom izložene tripsinu. Tripsin predstavlja proteolitički enzim koji se uvriježeno dodaje u radu sa staničnim kulturama, kako bi se stanice odvojile od podloge na kojoj su rasle (Thermo Fisher, 2022). Nakon 10 do 15 minuta zaustavljeno je djelovanje tripsina kako ne bi došlo do razgradnje staničnih komponenti, tako što je on odstranjen iz T-boci te je dodan svježi medij. Potom je određen broj stanica, tako da je 10 µL svake stanične suspenzije nanoseno na Bürker-Türkovu komoricu te prebrojano pod svjetlosnim mikroskopom. Bürker-Türkova komorica sastoji se od 9 velikih kvadrata površine 1 mm², od čega 4 velika vanjska, koji se sastoje od po 16 malih kvadrata, služe za brojanje stanica (slika 11). Broj stanica dobiven je kao srednja vrijednost stanica izbrojanih u 4 vanjska velika kvadrata, te je dodatkom izračunatog volumena medija u ishodišnu suspenziju stanica, koncentracija stanica podešena na 10⁵ stanica mL⁻¹, za uporabu u daljnjim eksperimentima.



Slika 11. Bürker-Türkova komorica za brojanje stanica (prema Brand, 2023)

3.2.5. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na humane stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27, HepG2)

Metoda koja se koristila kako bi se odredio citotoksični učinak jagode na humanim staničnim linijama je Neutral red. Neutral red metoda predstavlja jednu od metoda za mjerenja

stanične vijabilnosti i određivanje citotoksičnosti određenog biomaterijala (Hussain i sur., 2009). Test se bazira na mogućnosti živih stanica da vežu i unesu boju Neutral red. Boja Neutral red lako difundira kroz staničnu membranu, te se akumulira u lizosomima. S druge strane, mrtve stanice imaju dezintegriranu staničnu membranu, te ne mogu unositi Neutral red. Prema tome, žive stanice se mogu razaznati od mrtvih prema njihovoj sposobnosti unosa Neutral red boje. Test se koristi kada se ispituje neki potencijalno citotoksični materijal, koji bez obzira na mehanizam djelovanja, može zaustaviti proces unosa boje te naposljetku rezultirati u redukciji broja živih stanica. Jedna od prednosti ove metode određivanja stanične vijabilnosti jeste da na mjerenje ne utječe moguća mikroba kontaminacija, koja često može dovesti do precjenjivanja broja živih stanica (Ates i sur., 2017).

U ovom eksperimentu, specifično, ova metoda je provedena tako da je prvenstveno 100 μL stanične suspenzije pojedine stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27, i HepG2) naciepljeno u mikrotitarsku pločicu sa 96 jažica. Početna koncentracija stanica bila je kako je prethodno navedeno 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata, ukonjen je medij, te su stanice tretirane s po 100 μL otopina ekstrakta jagode u 4 različite koncentracije (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL^{-1}). Kao kontrola dodano je po 100 μL hranjivog medija Ham's F-12, bez ekstrakta jagode. Također, bitno je napomenuti da je svaka koncentracija ekstrakta jagode na svakoj staničnoj liniji testirana u tri paralele. Duljina tretmana ovisila je o tipu stanične linije. Stanična linija AGS izlagana je 2 sata, stanična linija CaCo-2 izlagana je 4 sata, stanična linija Cal27 izlagana je 15 minuta, te je stanična linija HepG2 izlagana 2 sata ekstraktu jagode. Nakon što je tretman završen, uklonjen je ekstrakt jagode s medijem, te je u svaku jažicu dodano 100 μL radne otopine Neutral red. Inkubacija sa bojom Neutral red odvijala se 45 minuta u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i atmosferi 5 % CO_2 i 95 % zraka. Naposljetku je, nakon završetka tretmana, boja uklonjena, te su stanice koje su izlagane koncentraciji ekstrakta jagode 0,00014, 0,0014, i 0,2 mg mL^{-1} isprane dva puta s po 100 μL PBS pufera, a stanice koje su bile izlagane koncentraciji ekstrakta jagode 1 mg mL^{-1} isprane su četiri puta s po 100 μL PBS pufera kako bi se uklonio višak boje. Potom je u svaku jažicu dodano 100 μL otopine za odbojavanje, kako bi se boja izvukla iz samih stanica, te je intenzitet obojenja izmjeren spektrofotometrijski na valnoj duljini $\lambda = 540 \text{ nm}$. Izmjerena apsorbancija boje u stanicama, proporcionalna je preživljenju stanica, što se kasnije izračunalo prema formuli [1].

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540}(\text{ekstrakt})}{A_{540}(\text{kontrola})} \cdot 100$$

[1]

A_{540} = apsorbancija izmjerena na valnoj duljini 540 nm.

3.2.6. Testiranje oksidacijskog učinka ekstrakta jagode na humane stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27, HepG2)

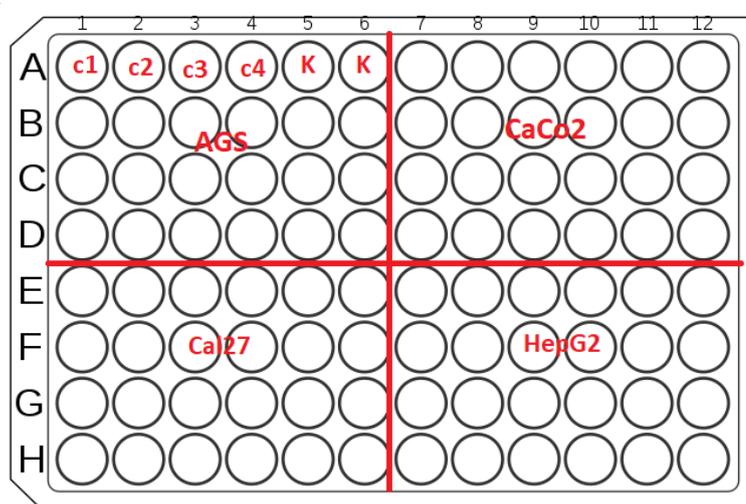
Metoda koja se koristila kako bi se ispitaio oksidacijski učinak ekstrakta jagode na humane stanične linije jeste metoda korištenja diklordihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA). Ova metoda je jedna od najčešće upotrebljivanih za direktno mjerenje redoks stanja stanica, te ima nekoliko prednosti u odnosu na ostale, kao što su lakoća provođenja, visoka osjetljivost na promjene redoks stanja stanice, te je relativno jeftina (Eruslanov i Kusmartsev, 2010). DCFH-DA je fluorogena boja koja mjeri hidroksilne, peroksilne kao i ostale reaktivne kisikove vrste (ROS) unutar stanica. Ovaj test bazira se na difuziji diklordihidrofluorescein diacetata u stanicu. Nakon što uđe u stanicu, DCFH-DA se pomoću staničnih enzima esteraza deacetilira i konvertira u ne-fluorescentni spoj, kojeg ROS-ovi oksidiraju do 2', 7' –diklorofluoresceina (DCF). Diklorofluorescein (DCF) je fluorescentni spoj, čije se prisustvo detektira pomoću fluorescentne spektroskopije sa ekscitacijom na 485 nm, i emisijom na 530 nm (Abcam, 2023).

Isto kao i kod određivanja citotoksičnosti ekstrakta jagode, prvi korak testiranja oksidacijskog učinka ekstrakta jagode, bio je naciepljivanje po 100 μL svake stanične linije (AGS, CaCo-2, Cal27 i HepG2) u mikrotitarsku ploču od 96 jažica. Koncentracije stanica su bile na 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon 24-satne kultivacije stanica u inkubatoru (temperatura $37\text{ }^\circ\text{C}$ i atmosfera 95 % zraka i 5 % CO_2), stanice su formirale subkonfluentni monosloj, koji je promatran pod svjetlosnim mikroskopom. Tada su stanice spremne za tretiranje s ekstraktom jagode. Kao i kod testiranja citotoksičnosti, korištene su četiri različite koncentracije ekstrakta jagode, točnije 0,00014; 0,0014; 0,2 i 1 mg mL^{-1} koje su pripremljene u Ham's F-12 hranjivom mediju, te je svaka od ovih koncentracija na svakoj korištenoj staničnoj liniji testirana u četiri paralele (slika 12). Također, u kontrolne jažice dodano je 100 μL Ham's F-12 hranjivog medija, bez ekstrakta jagode. Vrijeme izlaganja ekstraktu jagode, ovisilo je o vrsti stanične linije. Tako su stanice AGS izlagane 2 sata, stanična linija CaCo-2 izlagana je 4 sata, stanična linija Cal27 izlagana je 15 minuta, te je stanična linija HepG2 izlagana 2 sata ekstraktu jagode. Po završetku tretmana, uklonjen je istrošeni hranjivi medij s ekstraktom, a stanice izlagane koncentracijama ekstrakta 0,0014; 0,0014; 0,2 mg mL^{-1} isprane su dva puta sa 100 μL PBS pufera, dok su stanice izlagane koncentraciji 1 mg mL^{-1} isprane četiri puta sa 100 μL PBS pufera. Nakon toga je u svaku jažicu dodano 100 μL radne otopine DCFH-DA, te je slijedila inkubacija u trajanju od

30 minuta u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i atmosferi 95 % zraka i 5 % CO₂. Potom je izmjeren intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini emisije $\lambda = 485$ nm i valnoj duljini ekscitacije $\lambda = 530$ nm. Oksidacijska i antioksidacijska svojstva ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama, analizirana su prema formuli za izračunavanje indukcije slobodnih radikala [2].

$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (ekstrakt)}}{\% \text{ preživljenja}}}{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (kontrola)}}{100}}$$

[2]



Slika 12. Shematski prikaz podjele mikrotitarske jažice kod Neutral red testa i DCFH-DA testa (prema Wikimedia, 2023)

3.2.7. Testiranje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta jagode na modelnoj DNA

Jedan od eksperimenata koji je proveden u svrhu karakterizacije ekstrakta jagode jeste i testiranje njegovog biološkog učinka na modelnoj DNA. Modelna DNA koja se koristila u ovom eksperimentu je plazmid phiX174 RF1 u kojem DNA ima superzavijenu formu. Plazmid phiX174 RF1 može se oštetiti djelovanjem hidroksilnih radikala te u tom slučaju dolazi do prelaska iz superzavijene u zavijenu formu. U eksperimentalnim uvjetima, UV zračenje u prisustvu vodikovog peroksida dovodi do nastanka hidroksilnih radikala, a u ovom se eksperimentu pratilo da li ekstrakt jagode u različitim koncentracijama ima DNA protektivnu

ulogu. Kako bi se pratila promjena plazmida phiX174 RF1 iz stabilnije superzavijene u nestabilniju kružnu formu provedena je elektroforeza u agaroznom gelu.

Prema definiciji, elektroforeza predstavlja laboratorijsku metodu koja se koristi kako bi se molekule DNA, RNA i proteina razdvojile prema njihovoj veličini i naboju. Ove molekule razdvajaju se u gelu ili matriksu, te je električna struja sila koja ih pokreće. U općem smislu, elektroforeza predstavlja migraciju i razdvajanje nabijenih čestica, iona pod utjecajem električnog polja. Elektroforetski sustav se sastoji od dvije elektrode, pozitivno nabijene anode i negativno nabijene katode, koje su povezane kondukcijskim medijem, koji se naziva elektrolit. Separacijski efekt na nabijene molekule rezultira iz razlike u njihovoj brzini kretanja (v), koja je rezultat njihove mobilnosti (m), pri čemu je ona određena s veličinom, oblikom, nabojem molekule, temperaturom, pH i viskoznošću pufera, i jačine električnog polja (E), ($v=Me$). Pravilo je da se zbog pora u gelu, koje na neki način djeluju kao sito, manje molekule sporije kreću u odnosu na veće (Fritsch i Krause, 2003). Elektroforezu specifičnu za analizu nukleinskih kiselina otkrio je Vin Thorne 1960.-e istraživajući fragmente DNA virusa (NIH, 2023). Nukleinske kiseline obzirom da su negativno nabijene, zbog fosfatnih skupina u svom sastavu, putuju od negativne (katode) ka pozitivnoj (anodi) elektrodi. DNA ili RNA elektroforeza najčešće se odvija u agaroznom gelu kada se radi o razdvajanju većih fragmenata (10 - 50 000 pb), dok se poliakrilamidni gel koristi za razdvajanje manjih fragmenata (do 500 pb). Standardi poznatih veličina se također razdvajaju na istom gelu kao i uzorci, kako bi se prema njima mogla odrediti veličina molekula u uzorcima.

Prvi korak u provođenju ovog eksperimenta bila je priprema 1 %-tnog agaroznog gela u TAE puferu. Nakon vaganja 1 g agaroze, ona se otapala u 100 mL 1xTAE pufera u mikrovalnoj pećnici, uz povremeno mješanje. Nakon grijanja, otopina agaroze je ohlađena na 65 °C, te je potom gel izljeven u kalup i ostavljen da se polimerizira. Kada se gel polimerizirao, sa kalupom je prebačen u kadicu za elektroforezu, te je nalijan 1x TAE pufer tako da prekriva gel. Sljedeći korak bila je priprema uzoraka koji su se nanosili na gel. Pripremljeno je ukupno 14 uzoraka. Uzorci od 7 do 14 sadržavali su 3 μ L ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) plazmida, 1 mL 3 %-tnog H_2O_2 , te različite koncentracije ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL^{-1}) kao i odgovarajući volumen 1x TE pufera do konačnog volumena reakcijske smjese od 20 μ L. Svi ovi uzorci su podvrgnuti djelovanju UV svjetla u trajanju od 5 minuta. Negativne kontrole (uzorci 1. i 2.) sadržavala su samo plazmid i 1x TE pufer. Druge kontrole (uzorci 3. i 4.) sadržavale su plazmid, 3 %-tni H_2O_2 i 1x TE pufer. Pozitivne kontrole (uzorci 5. i 6.),

sadržavale su plazmid, 3 %-tni H₂O₂, 1x TE pufer, te su bile podvrgnute UV zračenju u trajanju od 5 minuta.

Nakon što su svi uzorci pripremljeni i tretirani UV zračenjem, dodano je po 0,5 µL obojenog pufera koji sadrži bromtimol plavo (engl. *loading buffer*) kako bi se mogla vizualizirati migracija uzoraka u gelu, te su uzorci nanaseni u jažice gela. U posljednju 15.-tu jažicu dodano je 5 µL standarda. Potom je gel preliven 1x TE puferom, te je pokrenuta elektroforeza. Elektroforeza je trajala 2 sata, te se odvijala pri 60 V. Po završetku elektroforeze, gel je obojan u otopini etidij bromida u trajanju jednog sata. Naposljetku je gel izložen UV zračenju, kako bi se njegov sadržaj vizualizirao i analizirao.

3.2.8. Testiranje citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na predstavnike humane mikroflore

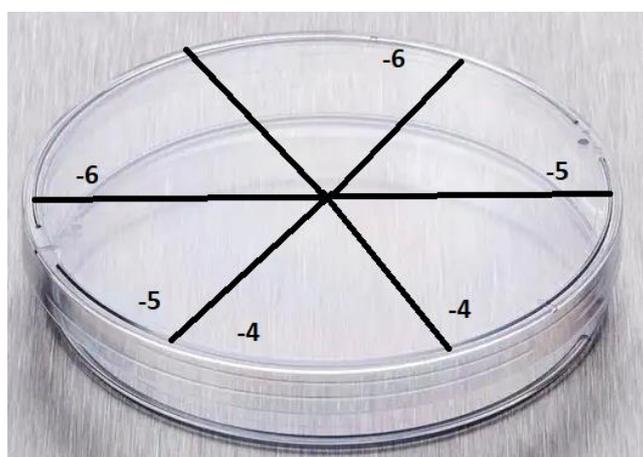
Pored testiranja citotoksičnosti ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama, u sklopu ovog rada ispitana je i citotoksičnost ekstrakta jagode na bakterijskim stanicama. Kao što je prethodno spomenuto (poglavlje 3.1.2.3.), u ovom radu upotrijebljena su tri različite bakterijske kulture, *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*. Ove bakterijske kulture, su 24 sata prije provođenja eksperimenta postavljene na uzgoj u odgovarajućim hranjivim podlogama, kako bi se na dan eksperimenta nalazile u ekspanzionalnoj fazi rasta. *Escherichia coli* je uzgajana u M9 kompletnoj hranjivoj podlozi, *Lactobacillus fermentum* je uzgajan u MRS hranjivoj podlozi, te je *Staphylococcus aureus* uzgajan u LB hranjivoj podlozi. Prvi korak nakon 24-satnog uzgoja bakterija, bio je odcentrifugirati po 1 mL svake bakterijske suspenzije. Centrifugiranje se odvijalo tijekom 10 minuta, pri 3000g. Nakon završetka centrifugiranja, supernatant se izdvojao, a talog isprao i resuspendirao s 1 mL PBS pufera. Centrifugiranje je potom ponovljeno, pri istim uvjetima. Po završetku centrifugiranja, talog se resuspendirao s 1 mL tekuće hranjive podloge koja odgovara određenoj staničnoj suspenziji. Potom je uslijedila priprema preinkubacijskih smjesa. Za svaki bakterijski soj pripremljeno je po 4 preinkubacijske smjese. Tri preinkubacijske smjese sadržavale su različite koncentracije ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014 i 0,2 mg mL⁻¹), odgovarajući bakterijski soj, te različit volumen odgovarajućeg hranjivog medija, dok je četvrta preinkubacijska smjesa služila kao kontrola te je sadržavala odgovarajuću bakterijsku suspenziju i odgovarajuću hranjivu podlogu. Ukupni volumen svih preinkubacijskih smjesa bio je 100 µL, te su one pripremane u malim epruvetama. Inkubacija smjesa trajala je 1 sat te se odvijala pri 37 °C.

Sljedeći korak u provođenju eksperimenta bilo je priprema mikrorazrjeđenja. Mikrorazrjeđenja su napravljena tako da je iz svake male epruvete uzeto po 10 μL inkubacijske smjese i razrijeđeno sa 90 μL PBS pufera. Mikrorazrjeđenja su rađena do koncentracije 10^{-6} . Potom je 10 μL razrjeđenja 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} nacijepljeno na odgovarajuće krute hranjive podloge (M9, MRS i LB) u dvije paralele (slika 13). Uzgoj stanica trajao je 24 sata. Nakon završetka uzgoja, izbrojan je broj poraslih kolonija bakterijskih stanica. Kao i kod humanih staničnih linija, izračunato je preživljenje i bakterija nakon izlaganja ekstraktu jagode, i to prema formuli [3].

$$\text{Preživljenje bakterija (\%)} = \frac{\text{CFU/mL bakterijske suspenzije}}{\text{CFU/mL kontrole}} \cdot 100$$

(engl. CFU – Colony-forming Unit)

[3]



Slika 13. Prikaz nacijepljivanja bakterijskih sojeva u Petrijevkama (prema Trafalgar Scientific, 2023)

3.2.9. Obrada podataka

U ovom radu, rezultati testiranja citotoksičnog učinka ekstrakta jagode na humane stanične linije (AGS, CaCo-2, Cal27, i HepG2) i bakterijske stanice (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*), kao i ispitavanje oksidacijskog djelovanja ekstrakta jagode na humane stanične linije obrađeni su u statističkom programu JASP (verzija 0.16.4.0.). Korištena je analiza varijance (ANOVA) i Tukey HSD *post hoc* test sa granicom statističke značajnosti $p < 0,05$. Rezultati testiranja genotoksičnog i protektivnog djelovanja ekstrakta jagode na modelnoj DNA (plazmid phiX174 RF1), obrađeni su u programu Gel analyzer. Grafički prikaz rezultata napravljen je u programu Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Učinci biološki aktivnih spojeva jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) ispitivani su kroz više testova, uključujući proliferacijsko i antiproliferacijsko djelovanje na humane i mikrobne stanične linije, antioksidacijski učinak na humane stanice, te DNA protektivno djelovanje. Eksperimenti su provedeni na humanim staničnim linijama pločastog epitela karcinoma jezika, Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre, HepG2, adenokarcinoma epitela želuca, AGS, te adenokarcinoma epitela debelog crijeva, Caco-2, bakterijama *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum*, i *Staphylococcus aureus*, te modelnoj makromolekuli, plazmidu phiX174 RF1 DNA. Raspon ispitivanih koncentracija odgovarao je preporučenom dnevnom unosu jagode, pri čemu koncentracija 0,0014 mg mL⁻¹ odgovara preporučenoj dnevnoj dozi. Druge koncentracije iznosile su 10x veću, 10x manju koncentraciju od preporučene dnevne doze, izražene po tjelesnoj masi i volumenu krvi.

Ekstrakt jagode pripremljen je ultrazvučnom ekstrakcijom nakon koje je određen ukupni sastav polifenolnih spojeva u ekstraktu jagode spektrofotometrijskim metodama.

Citotoksično i proliferativno djelovanje ekstrakta jagode na humanim staničnim linijama provedeno je Neutral red metodom. Antioksidativno i prooksidativno djelovanja ekstrakta jagode ispitano je DCFH-DA metodom.

Testiranje citotoksičnog i proliferativnog djelovanja ekstrakta jagode na bakterijama provedeno je pripravom mikrorazrjeđenja određene bakterijske suspenzije i brojanjem poraslih kolonija na podlozi nakon 24-satnog uzgoja.

DNA protektivni učinak ekstrakta jagode testiran je na modelnom plazmidu metodom elektroforezom u agaroznom gelu.

4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA BIOAKTIVNOG SASTAVA VODENOG EKSTRAKTA JAGODE

Koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu jagode, određena je kako je prethodno objašnjeno (poglavlje 3.2.2.) primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolorimetrskoj reakciji fenola sa reagensom Folin-Ciocalteu, dok su ukupni flavonoli i ukupne hidroksicimetne kiseline određeni mjerenjem intenziteta nastalog obojenja na 320 nm i 360 nm. Određivanje koncentracije polimernih proantocijanidina provedeno je u reakciji s vanilinom, te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri 500 nm. Naposljetku, koncentracija antocijana određena je mjerenjem apsorbancije pri dvije različite pH vrijednosti otopine, i određivanjem razlike među apsorbancijama različitih pH vrijednosti izmjerenih pri različitim valnim duljinama (520 nm i 700 nm). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta jagode

Bioaktivni spojevi	mg 100 g ⁻¹
Ukupni fenoli	111,55 ± 3,99
Hidroksicimetne kiseline	18,75 ± 1,70
Ukupni flavonoli	3,98 ± 0,01
Ukupni monomerni antocijani	10,99 ± 0,13
Ukupni procijanidini	64,35 ± 0,05

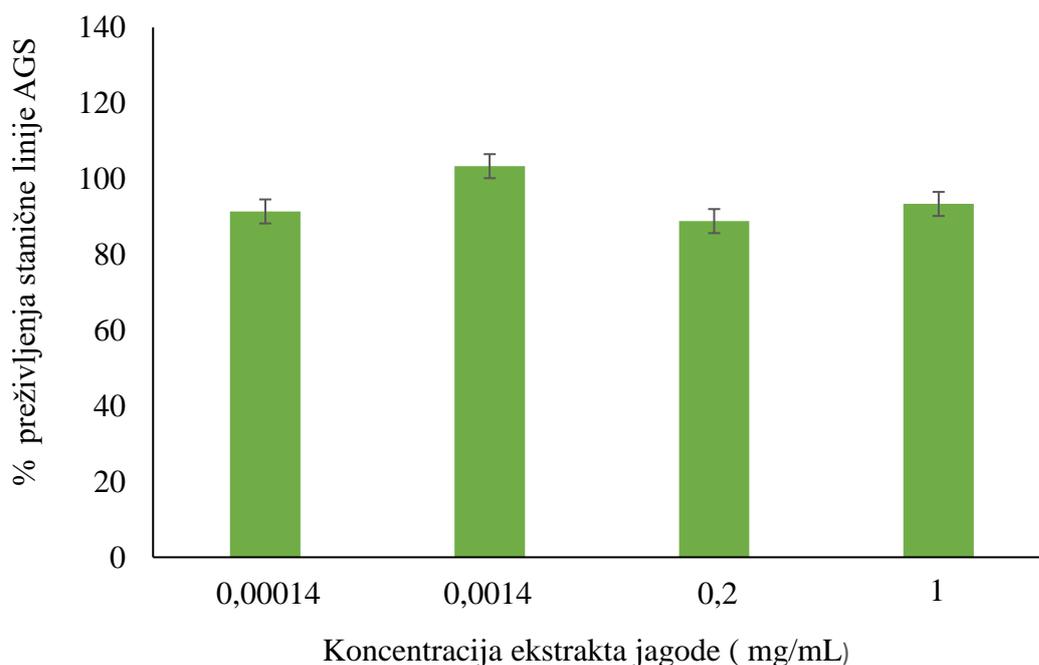
Prema rezultatima identifikacije bioaktivnih spojeva vodenog ekstrakta jagode (tablica 4), može se zaključiti da se procijanidini nalaze u najvećoj količini, dok se flavonoli nalaze u najmanjoj količini u ekstraktu. Pukalskienė i sur. (2021), u svojoj studiji uspoređivali su rezultate određivanja bioaktivnog sastava jagode koristeći dvije vrste otapala za ekstrakciju, etanol i vodu. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da se pri ekstrakciji sa etanolom, ekstrahira veća količina bioaktivnih komponenti kao što su antocijani u odnosu na ekstrakciju sa vodom. Upravo ovakav rezultat upućuje na razliku u samim uvjetima provođenja ekstrakcije. Naime, otapalo u kojem se provodi ekstrakcija ima veliku ulogu u količini ekstrahiranih bioaktivnih spojeva. Otapala kao što je etanol osiguravaju ekstrakciju veće količine hidrofobnih spojeva, što objašnjava razliku u dobivenim rezultatima (Pukalskienė i sur., 2021). Naposljetku, rezultati određivanja bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta jagode mogu varirati u ovisnosti o sortimentu jagode, lokalitetu uzgoja, klimatskih uvjeta i agrotehničkih mjera uzgoja, kao i o primjeni ekstrakcijske tehnologije.

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA CITOTOKSIČNOG UČINKA EKSTRAKTA JAGODE NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA

Citotoksični učinak ekstrakta jagode testiran je na četiri različite humane stanične linije, uključujući kako je prethodno navedeno, stanice karcinoma pločastog epitela jezika, Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre, HepG2, adenokarcinoma epitela želuca, AGS, te stanice adenokarcinoma epitela debelog crijeva, Caco-2. Testirane su četiri različite koncentracije ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL⁻¹), a metoda određivanja citotoksičnog učinka bila je Neutral red. Vrijeme izlaganja ekstraktu jagode ovisilo je o staničnoj liniji te su tako stanice HepG2 izlagane 2 sata, stanice AGS 2 sata, Caco-2 4 sata, i stanice Cal27, 15 minuta.

Rezultati koji su dobiveni prikazani su grafički kao ovisnost postotka preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izražena u odnosu na kotrolo) o koncentracijama ekstrakta jagode.

AGS

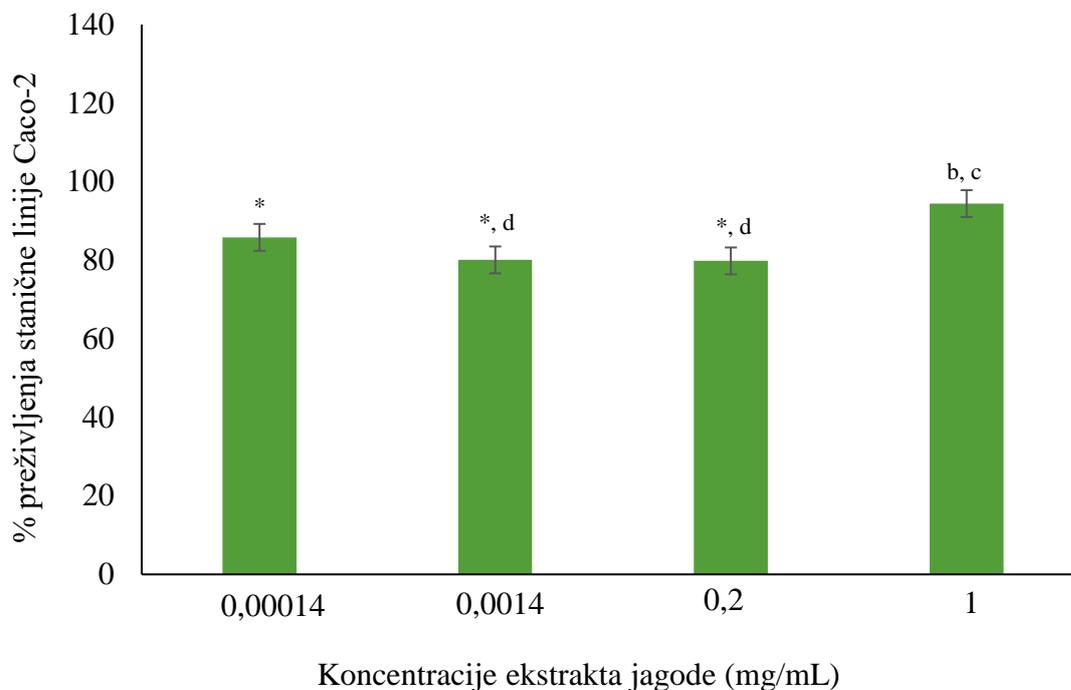


Slika 14. Preživljenje stanične linije AGS nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Kao što je vidljivo iz grafičkog prikaza na slici 14, niti jedna od testiranih koncentracija ekstrakta jagode ne pokazuje citotoksično djelovanje na AGS stanice. Odnosno, preživljenje

stanica djelovanjem cijelog koncentracijskog raspona ekstrakta jagode, nije se statistički značajno razlikovalo u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Caco-2

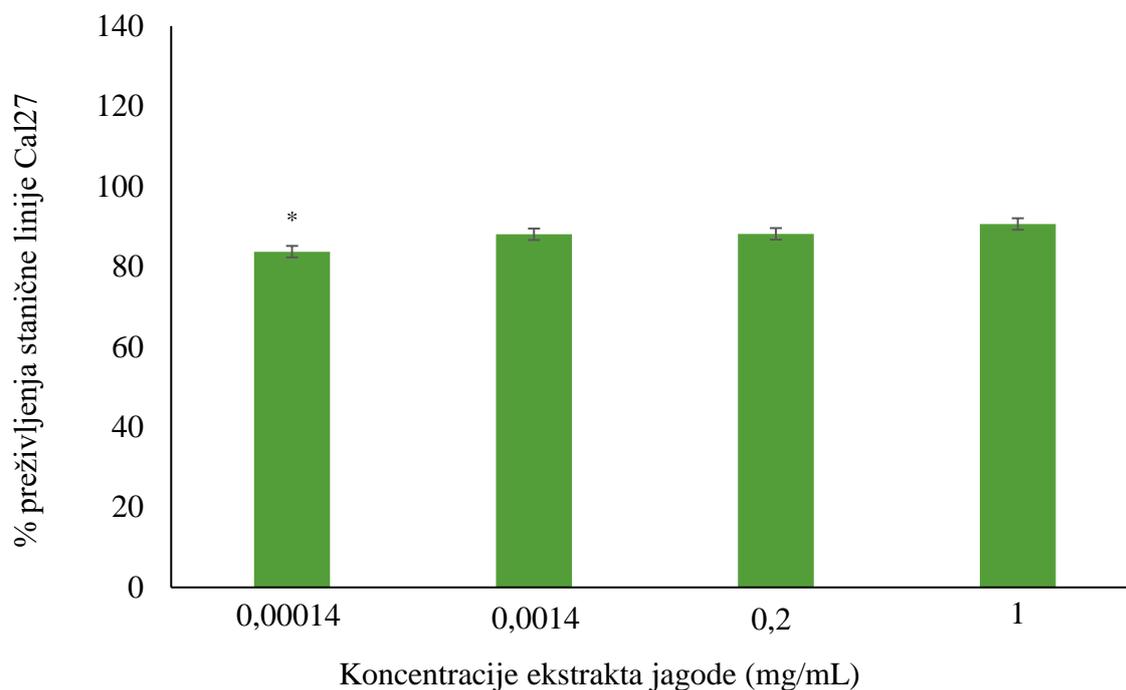


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$)

Slika 15. Preživljenje stanica Caco-2 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Iz rezultata vidljivih na grafičkom prikazu (slika 15), vidi se da ekstrakt jagode djeluje citotoksično na staničnu liniju Caco-2, obzirom da kod koncentracija $0,00014$; $0,0014$ i $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ dolazi do statistički značajnog smanjenja preživljenja u odnosu na kontrolu. Kod najveće koncentracije od 1 mg mL^{-1} , pak, ekstrakt jagode nema citotoksični učinak, obzirom da se ne primjeti statistički značajna promjena vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu.

Cal27

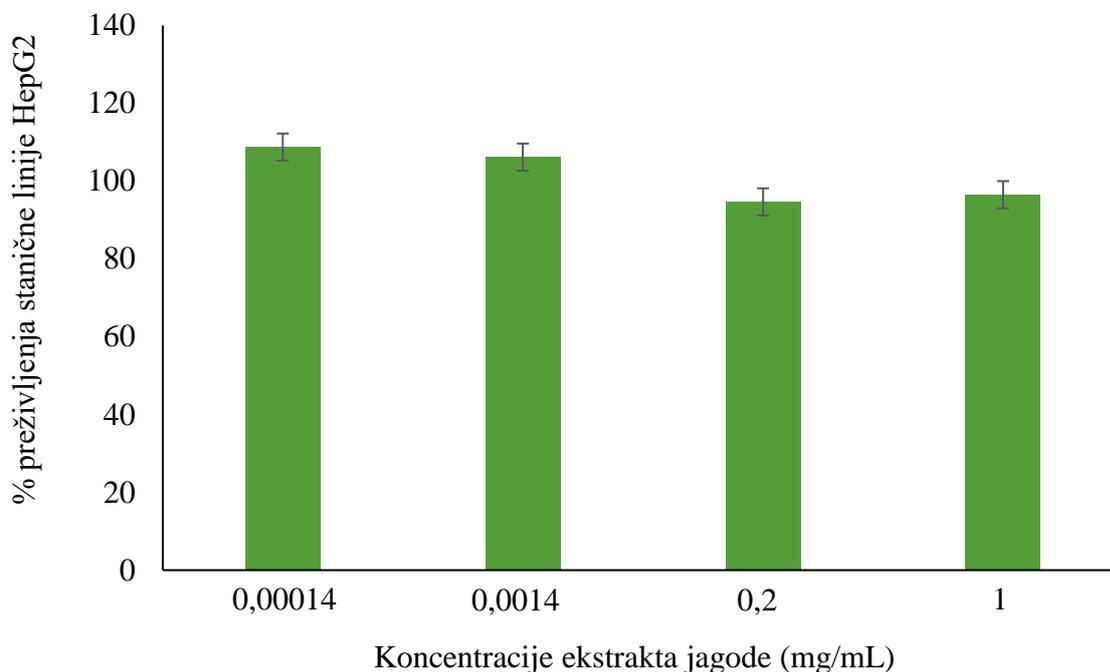


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$)

Slika 16. Preživljenje stanica Cal27 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Prema rezultatima na slici 16, može se primjetiti da povećanjem koncentracije ekstrakta jagode, blago raste i preživljenje stanične linije Cal27. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti, primjećeno je samo kod najmanje koncentracije ekstrakta, $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$. Ovakvi rezultati upućuju na to da ekstrakt jagode nema citotoksičan učinak na stanice Cal27 pri većim koncentracijama.

HepG2



Slika 17. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Nakon izlaganja stanične linije HepG2 koncentracijskom rasponu ekstrakta jagode, iz predstavljenih rezultata (slika 17), može se zaključiti da jagoda nema citotoksičan učinak na stanice ove stanične linije, obzirom da se ne primjećuje statistički značajno smanjenje vijabilnosti u odnosu na kontrolu niti kod jedne koncentracije.

Prema rezultatima (slika 14, 15, 16, 17) dobivenim istraživanjem citotoksičnosti vodenog ekstrakta jagode na četiri stanične linije (AGS, Caco-2, Cal27 i HepG2), može se zaključiti da citotoksični učinak jagode prvenstveno ovisi o vrsti stanične linije. Ekstrakt jagode ima citotoksično djelovanje na stanice epitela debelog crijeva Caco-2 i stanice epitela jezika Cal27, obzirom da je vijabilnost ovih stanica nakon izlaganja određenim koncentracijama ekstrakta jagode statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, ekstrakt jagode u ovom istraživanju ne pokazuje citotoksični učinak na stanice epitela želuca AGS, kao i HepG2 stanice jetre, u cijelom koncentracijskom rasponu. Citotoksični učinak jagode može se povezati s antiproliferativnim svojstvima hidroksicimetnih kiselina koje čine jednu od najzastupljenijih komponenti ekstrakta (tablica 4). U istraživanju Suoza Rosa i sur. (2018), ustanovljeno je da hidroksicimetne kiseline inhibiraju rast humane stanične linije adenokarcinoma crijeva, HT-29, i to proporcionalno s koncentracijom (10-100 μ M) nakon 24

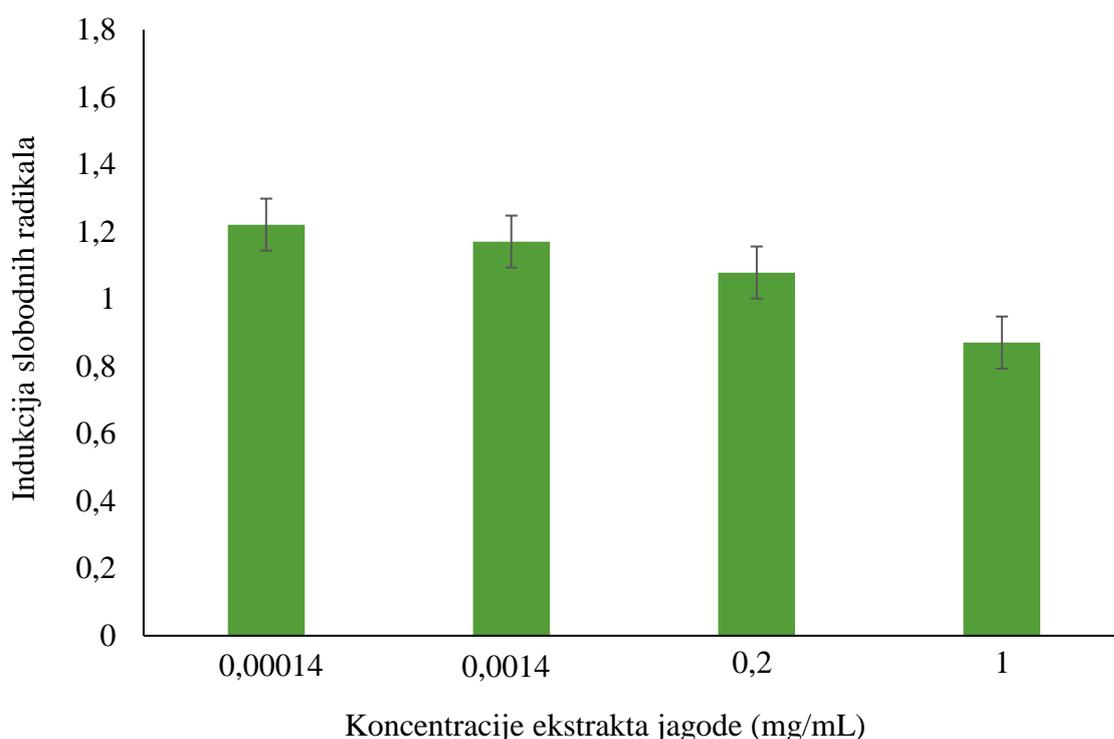
sata tretmana (Suoza Rosa i sur., 2018). Također, Janicke i sur. (2010) su u svom istraživanju potvrdili antiproliferativno djelovanje hidroksicimetnih kiselina, pokazavši da ferulinska i *p*-kumarinska kiselina koje pripadaju skupini hidroksicimetnih kiselina smanjuju proliferaciju stanica epitela debelog crijeva, Caco-2 za 43-75 % nakon dva do tri dana tretmana. Iako mehanizmi antikancerogenog djelovanja fenolnih kiselina još uvijek nisu dovoljno istraženi, smatra se da oni uključuju neutralizaciju slobodnih radikala, regulaciju ekspresije gena, modulaciju staničnih puteva signalizacije uključenih u popravak DNA, te indukciju apoptotičkih enzima koji u konačnici dovode do smrti stanice. Nasuprot tome, smatra se da polifenoli mogu uzrokovati i lipidnu peroksidaciju, i oštećenja DNA (Janicke i sur., 2010). Naposljetku uspoređujući rezultate ovog s prethodnim istraživanjima može se zaključiti da vrsta stanica determinira njihovu senzibilnost na određene biološke komponente ekstrakta jagode. Samim tim, njihova vijabilnost je direktno uvjetovana njihovom podložnošću na djelovanje hidroksicimentih kiselina i njihovih antiproliferativnih svojstava, odnosno mogućnošću adaptacije na novonastale okolišne uvjete.

Kao što je prethodno spomenuto kod staničnih linija HepG2 i AGS, ekstrakt jagode ne pokazuje citotoksični učinak niti kod jedne koncentracije. U istraživanju Forbes-Hernandez, pokazano je da nakon tretmana od 24 sata, ekstrakt jagode u koncentracijama (25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 7500 and 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nema citotoksični učinak na tri humane stanične linije, uključujući makrofage, fibroblaste (HDF), i stanice jetre HepG2. Pored vrste stanica i trajanja tretmana, ovakav rezultat može se objasniti i djelovanjem fenolnih komponenti ekstrakta jagode, koji imaju svojstvo indukcije detoksifikacijskih enzima u stanicama. Međutim, nasuprot tome, u istom istraživanju kod stanica HepG2 detektirano je smanjenje preživljenja kod koncentracije 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kada se vrijeme izlaganja produljilo na 48 i 72 sata (Forbes-Hernandez i sur., 2016). Jedan od mogućih razloga u razlici između rezultata dobivenih u studiji Forbes-Hernandez sa rezultatima u ovom radu pored razlike u vremenu izlaganja stanica HepG2, je razlika u otapalu korištenom za ekstrakciju. Organska otapala koja su korištena za ekstrakciju u studiji Forbes-Hernandez općenito ekstrahiraju više hidrofobnih komponenti odgovornih za antiproliferativno djelovanje u odnosu na destiliranu vodu koja je korištena za ekstrakciju u ovom radu.

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG I PROOKSIDACIJSKOG UČINKA EKSTRAKTA JAGODE NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA

Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta jagode testiran je pomoću DCFH-DA metode (poglavlje 3.2.6.) na humanim staničnim linijama AGS, Caco-2, Cal27 i HepG2. Koncentracije ekstrakta jagode koje su testirane iste su kao i kod određivanja citotoksičnosti (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL⁻¹). Omjer vrijednosti intenziteta fluorescencije nakon tretmana i preživljenja stanica određenog Neutral red metodom u odnosu na kontrolu, izračunat je kako bi se odredila indukcija slobodnih radikala. Tako su rezultati prikazani grafički kao ovisnost indukcije slobodnih radikala o koncentracijama ekstrakta jagode.

AGS

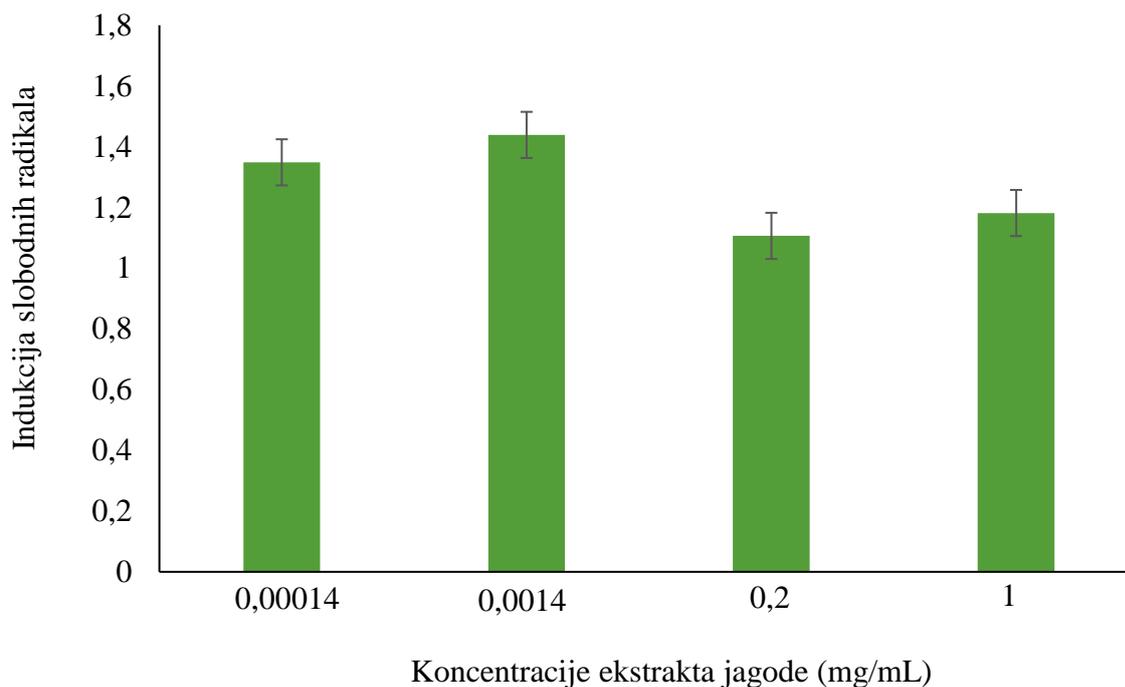


Slika 18. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Nakon tretmana AGS stanica sa različitim koncentracijama ekstrakta jagode, dobiveni su rezultati indukcije slobodnih radikala prikazani na grafičkom prikazu (slika 18). Kao što se može vidjeti iz grafičkog prikaza, niti kod ijedne testirane koncentracije, nije izmjerena statistički značajna razlika indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu. Samim tim,

može se zaključiti da ne dolazi niti do indukcije niti inhibicije slobodnih radikala, te se tako kod stanične linije AGS ne može govoriti niti o prooksidativnom niti o antioksidativnom djelovanju ekstrakta jagode.

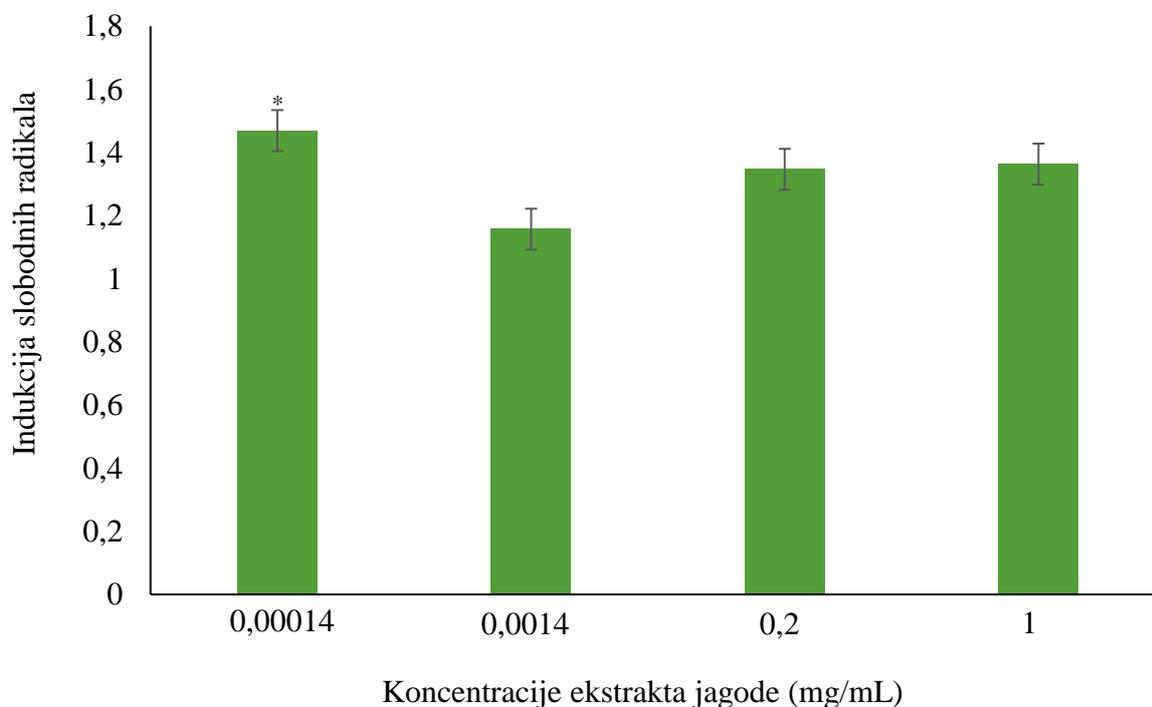
Caco-2



Slika 19. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Iz rezultata prikazanih na grafičkom prikazu (slika 19), vidljivo je da ekstrakt jagode ne pokazuje prooksidativno i antioksidativno djelovanje na stanice Caco-2, obzirom da nije izmjerena statistički značajan razlika u odnosu na kontrolu niti kod ijedne testirane koncentracije.

Cal27

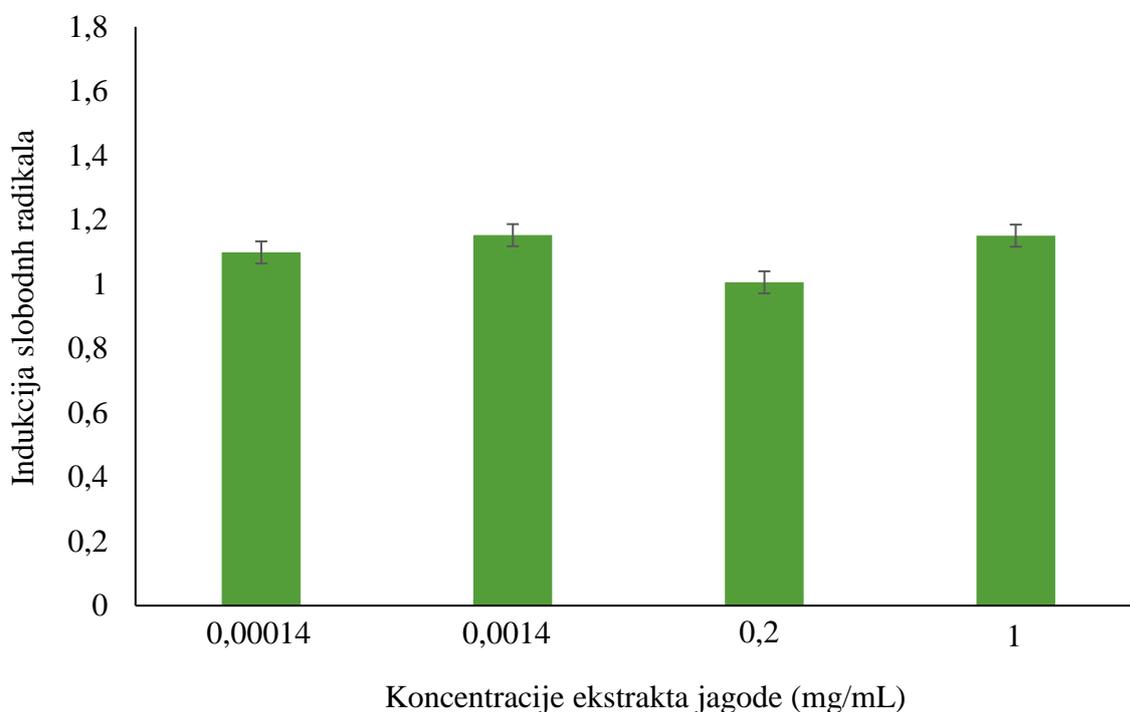


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d – statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$)

Slika 20. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Cal27 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Prema rezultatima testiranja prooksidativnog/antioksidativnog djelovanja jagode na staničnoj liniji Cal27 (slika 20), vidljivo da jedino kod najniže koncentracije $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ekstrakt inducira nastanak slobodnih radikala, odnosno ima prooksidativno djelovanje. Kod ostalih koncentracija ($0,0014$; $0,2$; 1 mg mL^{-1}) nije izmjerena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, te se može zaključiti da kod tih koncentracija ekstrakt nema niti prooksidativno niti antioksidativno djelovanje.

HepG2



Slika 21. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Ekstrakt jagode kod stanica HepG2 u cijelom koncentracijskom rasponu ne pokazuje niti prooksidativno niti antioksidativno djelovanje, obzirom da niti kod ijedne koncentracije nije zabilježeno statistički značajno smanjenje ili povećanje indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu.

Iz rezultata prikazanih na slikama 18, 19, 20 i 21, može se zaključiti da prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta jagode, kao i citotoksični učinak, najviše ovisi o vrsti stanica koje su izlagane. Kada se govori o prooksidativnom djelovanju ekstrakta jagode, ono je izmjereno samo kod stanica Cal27 kod koncentracije 0,00014 mg mL⁻¹. Antioksidativno djelovanje ekstrakta nije zabilježeno niti kod ijedne stanične linije.

Kako je prethodno spomenuto, oksidativni stres nastaje kao posljedica prekomjerne proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, ROS-ova, te rezultira različitim oštećenjima staničnih makromolekula, pa konačno i smrću stanica. Oksidativni stres se tako povezuje s brojnim oboljenjima današnjice kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i upalni procesi u tijelu. Upravo iz tog razloga biljni polifenoli postali su fokus sve više istraživanja, zbog svojih

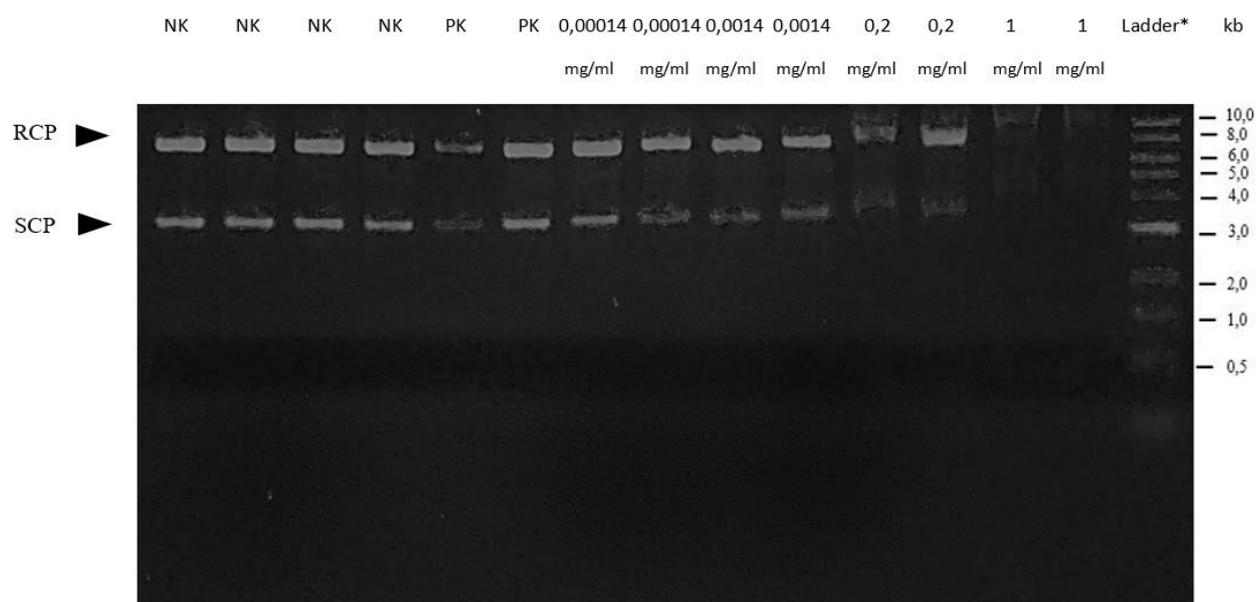
antioksidativnih svojstava. Isto tako, biljni polifenoli u ovisnosti o uvjetima mogu imati i prooksidativni karakter. Tako naprimjer, kada se nađu u alkalnom mediju, polifenoli zbog svoje nestabilnosti, autooksidiraju i povećavaju proizvodnju ROS-ova. Ipak, istraživanja i dokazi o antioksidativnom djelovanju polifenola uvelike premašuju dokaze o njihovom prooksidativnom djelovanju (Hussain i sur., 2016).

Jedan od glavnih mehanizama za održavanje količine slobodnih radikala u organizmu na zadovoljavajućoj razini jeste prisustvo reducirajuće forme tripeptida glutationa (GSH), u odnosu na oksidiranu formu (GSSG), a to podrazumijeva transaktivaciju gena koji kodiraju enzime za sintezu GSH. Ti enzimi uključeni su u fazu II detoksifikacijskog sustava. Smatra se da prooksidirajući karakter polifenola, odnosno ROS-ovi koji nastaju njihovom autooksidacijom smanjuju razinu GSH u stanici, što predstavlja signal za aktivaciju transkripcije gena za γ -glutamil cistein sintetazu. Kao što je vidljivo iz predočenih rezultata ali i drugih studija, polifenoli pri nižim koncentracijama proizvode niže razine ROS-ova, uzrokujući blagi oksidativni stres. Blagi oksidativni stres, uzrokuje aktivaciju staničnog obrambenog antioksidativnog sustava sinteze GSH. Prema tome, može se zaključiti da je kod svih staničnih linija autooksidacija polifenolnih spojeva jagode inducirala blagi oksidativni stres (Babich i sur., 2011). To je rezultiralo aktivacijom antioksidativnih staničnih mehanizama, što se očituje time da niti kod jedne stanične linije, osim Cal27 i koncentracije $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$, nije zabilježen statistički značajan porast indukcije slobodnih radikala. Također, bitan parametar koji potvrđuje da polifenolni spojevi jagode nemaju prooksidativno djelovanje jeste da se nastajanje slobodnih radikala ne može dovesti u direktnu vezu sa smanjenjem vijabilnosti kod niti jedne stanične linije, odnosno da ROS-ovi nisu uzrokovali oštećenje bitnih staničnih makromolekula.

Naposlijetku, rezultati ovog rada potvrđuju potencijalnu ulogu polifenola jagode u borbi protiv oksidativnog stresa i posljedica koje on ima na zdravlje ljudi. U isto vrijeme predstavlja i dobar temelj za naredna istraživanja o antioksidativnom djelovanju polifenolnih spojeva jagode kako na ovim tako i drugim humanim staničnim linijama.

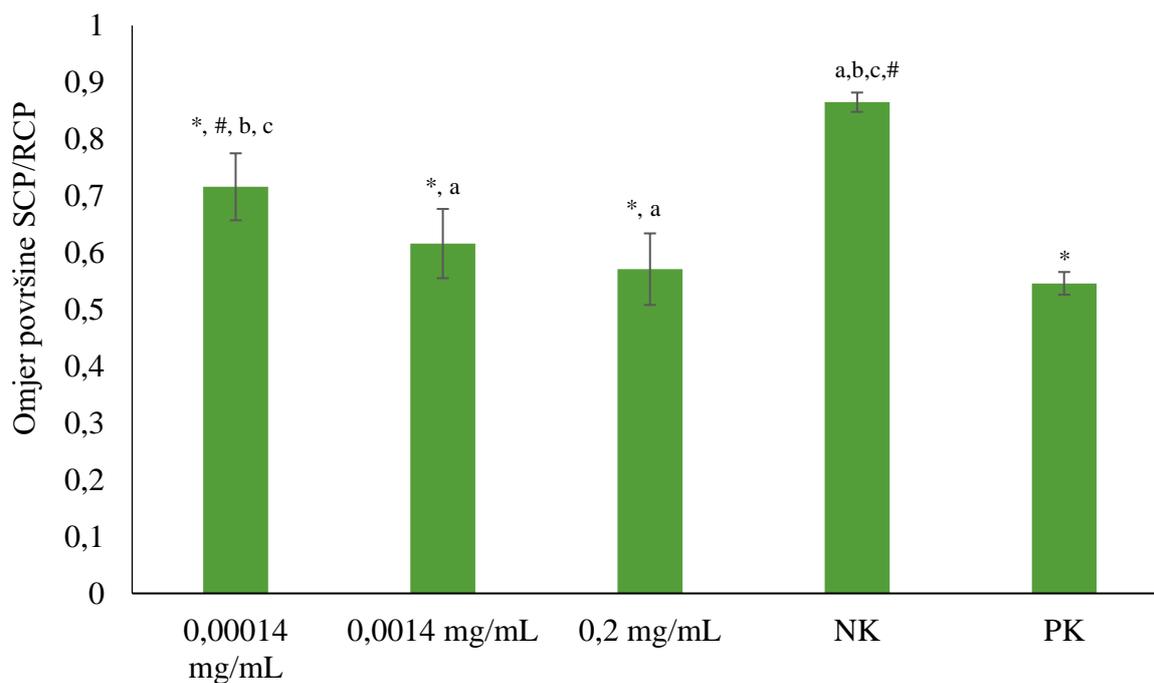
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA GENOTOKSIČNOG I PROTEKTIVNOG UČINKA EKSTRAKTA JAGODE NA MODELNOJ DNA

Protektivni učinak ekstrakta jagode na DNA ispitan je, kako je prethodno objašnjeno (poglavlje 3.1.) na modelnoj makromolekuli, plazmidu phiX174 RF1 DNA. Testirane su četiri različite koncentracije ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL⁻¹), te je plazmid pored ekstrakta bio izložen i djelovanju hidroksilnih radikala nastalih djelovanjem UV zračenja na H₂O₂. Nakon tretmana, provedena je elektroforeza u agaroznom gelu, te su rezultati u obliku vrpce na gelu vizualizirani bojanjem gela u otopini etidij bromida (slika 22). Pored slike gela, rezultati su prikazani u obliku grafičkog prikaza, mjerenjem omjera superzavijene forme u odnosu na relaksiranu formu plazmida (SCP/RCP). Ako dođe do oštećenja DNA, plazmid promijeni konformaciju iz superzavijene cirkularne (SCP) u relaksiranu cirkularnu formu (RCP). Kada se nalazi u relaksiranoj formi, plazmid putuje sporije u gelu, u odnosu na superzavijenu formu.



*1kb DNA Ladder; SCP- superzavijena cirkularna forma plazmida, RCP- relaksirana cirkularna forma plazmida.

Slika 22. Protektivni učinak ekstrakta jagode na plazmidu phiX174 RF1 DNA



NK-negativna kontrola, PK- pozitivna kontrola

* - statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,001$); # - statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 23. Grafički prikaz superzavijene u odnosu na relaksiranu formu plazmida (ϕ X174 RF1 DNA) kod različitih koncentracija ekstrakta jagode

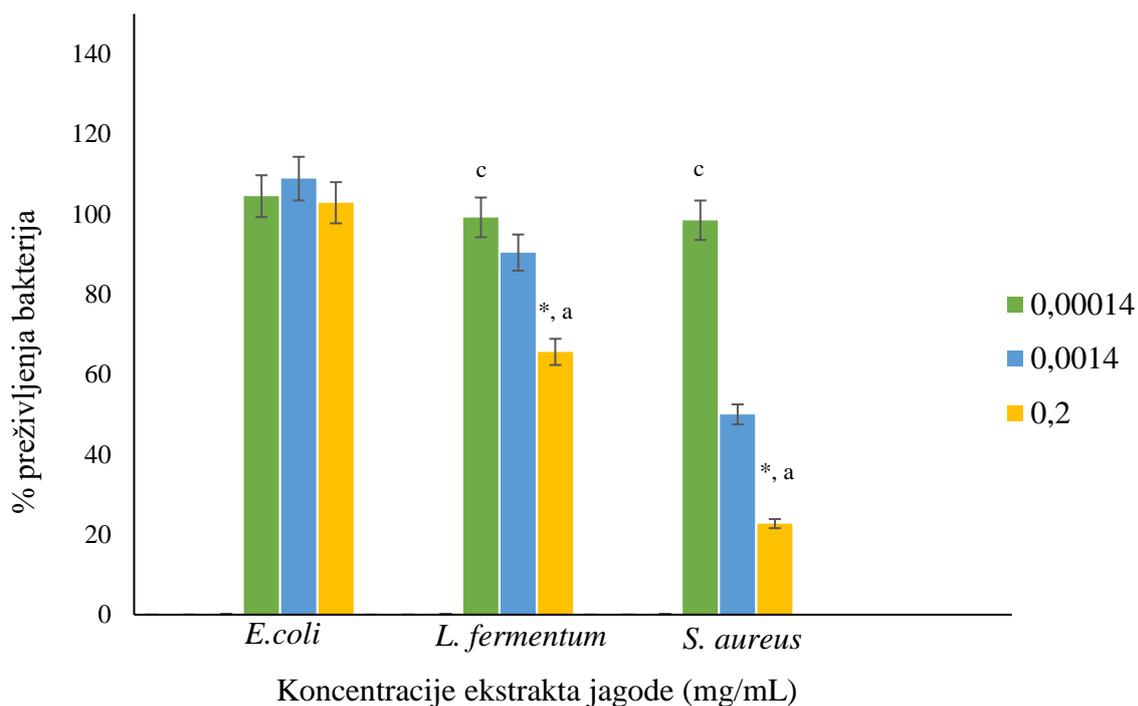
Prema rezultatima prikazanim na slikama 22 i 23, može se donijeti nekoliko zaključaka o djelovanju ekstrakta jagode na modelnu DNA. Prvenstveno, na slici 22 vidljivo je da se kod negativnih kontrola (NK) većina plazmida nalazi u superzavijenoj cirkularnoj formi (SCP), obzirom da daje jači signal u odnosu na relaksiranu formu (RCP). Ovakav zaključak potvrđuje i omjer superzavijene u odnosu na relaksiranu formu plazmida kod negativne kontrole prikazan na grafičkom prikazu na slici 23. U pozitivnoj kontroli (PK), više je zastupljena relaksiranija forma plazmida (RCP), obzirom da se očituje jačim intenzitetom vrpce u odnosu na superzavijenu formu, što se očituje kako na slici gela (slika 22) tako i u grafičkom prikazu omjera SCP/RCP (slika 23). Ovakvi rezultati dokazuju da sinergističko djelovanje dva agensa, UV zračenja i H_2O_2 , uzrokuje veće oštećenje DNA, od njihovog pojedinčanog djelovanja. Rezultati dobiveni kod uzoraka tretiranih ekstraktom jagode variraju ovisno o koncentraciji ekstrakta kojoj je plazmid izlagan. Kod uzoraka tretiranih s manjim koncentracijama ekstrakta jagode, $0,00014$ i $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$, iako je intenzitet vrpce za relaksiranu formu jači, jasno je

vidljiv i signal za postojanje superzavijene forme plazmide (slika 22). Omjer SCP/RCP na grafičkom prikazu (slika 23) za koncentracije 0,00014 i 0,0014 mg mL⁻¹, pokazuje da ekstrakt jagode u nižim koncentracijama ima genoprotektivni učinak. Kod viših koncentracija ekstrakta jagode 0,2 i 1 mg mL⁻¹, intenzitet vrpce za relaksiranu formu jači je od signala za superzavijenu formu, te se kod najveće koncentracije vrpce gotovo da i ne mogu identificirati (slika 22). Grafički prikaz, pak pokazuje da se kod koncentracije 0,2 mg mL⁻¹, više plazmida nalazi u superzavijenoj u odnosu na relaksiranu formu, što potvrđuje DNA protektivni učinak ekstrakta jagode i pri većoj koncentraciji.

Naposlijetku, može se zaključiti da tri ispitane koncentracije ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014; 0,2 mg mL⁻¹) sprečavaju nastanak hidroksilnih radikala koji bi doveli do razmotavanja superzavijene DNA u odnosu na pozitivnu kontrolu, iz čega proizlazi da biološki aktivni spojevi u ekstraktu jagode, u određenoj mjeri, imaju protektivni učinak na DNA. Usporedbom djelovanja različitih koncentracija ekstrakta jagode, pak, može se primjetiti da je genoprotektivni učinak veći pri nižim koncentracijama, dok s porastom koncentracije on opada. Prethodna istraživanja DNA protektivnog učinka jagode, rađena kako na modelnoj DNA ali i humanim fibroblastima, pokazala su slične rezultate. Također, smatra se da su glavni biološki aktivni spojevi zaslužni za genoprotektivna svojstva jagode, posebice kod oštećenja DNA uzrokovanih UV zračenjem, antocijani. Primarni mehanizam kojim antocijani djeluju protektivno je blokiranje staničnih oksidativnih procesa, kao što je to upalna reakcija ili apoptoza (Giampieri i sur., 2012).

4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA CITOTOKSIČNOG UČINKA EKSTRAKTA JAGODE NA PREDSTAVNIKE HUMANE MIKROFLORE

Kako bi se testirala citotoksičnost jagode na bakterijama, bakterijske suspenzije izlagane su različitim koncentracijama ekstrakta jagode (0,00014; 0,0014; 0,2; 1 mg mL⁻¹) u trajanju od 1 sata. Potom su suspenzije nacjepljene na odgovarajuće krute hranjive podloge, te su porasle kolonije izbrojane nakon 24 sata inkubacije. Preživljenje bakterija predstavljeno je na grafičkom prikazu (slika 24) kao postotak preživjelih kolonija u odnosu na kontrolu.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 24. Preživljenje bakterija *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta jagode

Prema rezultatima prikazanim na slici 24, može se donijeti nekoliko zaključaka o djelovanju ekstrakta jagode na preživljenje bakterija *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*. Kod bakterije *Staphylococcus aureus*, ekstrakt jagode pri koncentraciji $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ dovodi do statistički značajnog pada vijabilnosti u odnosu na kontrolu. Također ekstrakt pri ovoj koncentraciji dovodi do statistički značajnog pada vijabilnosti i kod bakterije *Lactobacillus fermentum*. Iz ovakvih rezultata proizlazi da ekstrakt jagode pri većim koncentracijama ima bakteriostatsko djelovanje na *L. fermentum* i *S. aureus*. Preživljenje *E. coli* nije statistički značajno promijenjeno u odnosu na kontrolu pri svim ispitanim koncentracijama ekstrakta jagode, kao ni preživljenje *L. fermentum* i *S. aureus* pri koncentracijama $0,00014 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,0014 \text{ mg mL}^{-1}$. Prema tome, može se zaključiti da ekstrakt jagode ne pokazuje bakteriostatsko djelovanje na *E. coli*, te *L. fermentum* i *S. aureus* kada se nalazi u nižim koncentracijama.

Glavni antimikrobni spojevi jagode koji moduliraju rast mikroorganizama jesu polifenoli. Različite vrste ovih spojeva imaju specifične mehanizme antimikrobnog djelovanja.

Flavonoidi, primjerice, dentaturiraju proteine i nukleinske kiseline bakterija na način da stvaraju komplekse sa njima putem vodikovih veza. Ovakvi uvjeti dovode do trajnog oštećenja baterijske stanice i naposljetku smrti (Sitorus i sur., 2012). Polifenolni spojevi također ostvaraju interakcije sa staničnim membranama te na taj način inaktiviraju enzime koji su esencijalni za preživljenje stanice. Nasuprot tome, Gyawali i Ibrahim (2012), predložili su da polifenoli mogu i indirektno djelovati toksično na mikroorganizme. Bakteriocidno djelovanje polifenola proizlazi i iz mogućnosti nekih polifenola da djeluju kao prooksidansi (Gyawali i Ibrahim, 2012).

Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata (slika 24), ekstrakt jagode ima različit učinak na preživljenje tri vrste bakterija. Prvi zaključak koji se može donijeti je da ekstrakt jagode odnosno antimikrobni spojevi u njemu imaju veći citotoksični učinak na Gram-pozitivne u odnosu na Gram-negativne bakterije. *S. aureus*, i *L. fermentum* kao Gram-pozitivne bakterije su kako je vidljivo iz rezultata (slika 24) puno osjetljivije na djelovanje ekstrakta jagode, u odnosu na *E.coli* koja je Gram-negativni predstavnik. Ovakvi rezultati i saznanja u skladu su s prethodnim istraživanjima antimikrobne aktivnosti jagode. Razlog razlike u osjetljivosti između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija proizlazi iz razlike u strukturi njihovog staničnog zida. Naime, u fosfolipidnoj membrani Gram-negativnih bakterija, za razliku od Gram-pozitivnih, nalaze se lipopolisaharidne komponente koje djeluju kao selektivna barijera hidrofilnim spojevima, kao što je vodena otopina jagode. Na taj način, Gram-negativne bakterije pružaju veću rezistenciju antimikrobnim komponentama i održavaju vijabilnost (Seleshe i sur., 2017). Također, bitno je naglasiti i razliku u postotku preživljenja između dvije vrste Gram-pozitivnih bakterija, odnosno *S. aureus* i *L. fermentum*. Primjetno je da je postotak preživljenja *L. fermentum* u cijelom koncentracijskom rasponu ekstrakta jagode veći u odnosu na *S. aureus*. Ovakav rezultat upućuje na interakciju između crijevne mikrobiote i prebiotika, odnosno polifenola. Naime, sve više je dokaza da bioaktivni sastojci biljaka, u ovom slučaju polifenoli jagode, mogu djelovati kao prebiotici, odnosno poticati rast i metabolizam probiotičkih bakterija, kao što je *L. fermentum*. S druge strane prebiotičko djelovanje polifenola koje povoljno utječe na sastav crijevne mikroflore je i bakteriocidno djelovanje na patogene bakterije kao što je to *S. aureus* (Plamada i Vodnar, 2022).

Neki od faktora koji su mogli utjecati na ukupno smanjeno antimikrobno djelovanje ekstrakta jagode, što je posebice vidljivo kod rezultata preživljenja kod *E.coli*, je način pripreme samog ekstrakta. Naime, istraživanja su pokazala da bioaktivne komponente, točnije polifenoli ispoljavaju svoja antimikrobna svojstva u manjoj ili većoj mjeri u ovisnosti od

otapala u kojem su ekstrahirani. U ovom radu kao otapalo za biljni materijal upotrebljavana je destilirana voda, dok rezultati istraživanja pokazuju da polifenoli iskazuju jače antimikrobno dejstvo kada su ekstrahirani u etanolu.

Naposljetku, prema rezultatima predstavljenim u ovom radu kao i prethodnim istraživanjima, može se zaključiti da polifenoli u ekstraktu jagode imaju jako antimikrobno djelovanje prema patogenoj bakteriji kao što je *S. aureus*. Klasični način liječenja infekcije *S. aureus* uključuje antibiotike, što je u zadnjih par godina dovelo do povećanja rezistencije bakterije na iste, te se stoga sve više traže alternativni terapijski pristupi. Upravo bioaktivne komponente voća kao što je jagoda predstavljaju nove mogućnosti borbe sa ovim patogenom (Cárdenas-Valdovinos i sur., 2018). Također, dokazani antimikrobni učinak jagode opravdava njenu uporabu kao i uporabu proizvoda baziranih na njoj kao funkcionalne hrane. Na kraju, potencijalna primjena ekstrakta jagode kao prebiotičkog pripravka, dobra je tema za naredna istraživanja obzirom da se zbog suprotnog djelovanja pri jako malim razlikama u primjenjenim koncentracijama (0,00014 i 0,0014 mg mL⁻¹ kod *L. fermentum*, slika 24) osim poticanja, događa i inhibicija rasta probiotičkih bakterijskih vrsta, što u konačnici može rezultirati narušavanjem humane crijevne mikroflore.

5. ZAKLJUČCI

1. U vodenom ekstraktu jagode utvrđena je koncentracija ukupnih fenola od 111,55 mg GAE 100 g⁻¹. U najvećem udjelu su određeni ukupni procijanidini, zatim hidroksicimetne kiseline, monomerni antocijani dok su ukupni flavonoli zastupljeni u najnižem udjelu.
2. Vodeni ekstrakt jagode djelovao je citotoksično na staničnu liniju adenokarcinoma debelog crijeva (Caco-2) u tri (0,00014; 0,0014; 1 mg mL⁻¹) od četiri ukupno ispitane koncentracije pri čemu je došlo do smanjenja preživljenja za 20 %. Deset puta niža koncentracija od dnevno preporučene doze djelovala je toksično na stanice karcinoma epitela usne šupljine (Cal27) smanjujući preživljenje za 20 %.
3. Vodeni ekstrakt jagode nije pokazao antioksidacijsko djelovanje niti na jednoj staničnoj liniji. Najniža istraživana koncentracija, koja odgovara 10 puta nižoj koncentraciji od dnevno preporučene doze izračunate prema kg tjelesne mase, djelovala je prooksidativno na stanice karcinoma epitela usne šupljine (Cal27). S druge strane, sve istraživane koncentracije pokazale su genoprotektivni učinak na modelu plazmida, s time da povećanjem koncentracije ekstrakta taj učinak pada.
4. Vodeni ekstrakt jagode nije imao antibakterijski učinak na predstavnika Gram-negativnih bakterija (*E.coli*), dok je na Gram-pozitivne imao antimikrobni učinak u koncentracijskoj ovisnosti. Jače antibakterijsko djelovanje potvrđeno je na bakteriji *S. aureus*, dok je probiotička bakterija *L. fermentum* bila manje osjetljiva.

6. LITERATURA

Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM (2017) Assaying cellular viability using the Neutral red uptake assay. *Methods in Mol Bio* **1601**, 19-26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2

Biolabtests (2023) Microbial Top Tests: *E. coli*. BIOLABTESTS – Bio Lab Tests, <https://biolabtests.com/top-facts-ecoli/>. Pristupljeno 2. veljače 2023.

Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL (2011) Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J Toxicol* **2011**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2011/467305>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Bosiljkov T, Kostelac D, Frece J, Markov K, Žigolić A, Kaurinović J, Pavlić B, Duralija B, Zavadlav S, Bursać Kovačević D (2023) 3D Printing of functional strawberry snacks: food design, texture, antioxidant bioactive compounds, and microbial stability. *Antioxidants*, 2023, **12(2)**, 436. DOI: 10.3390/antiox12020436

Bebek Markovinović A, Putnik P, Stulić V, Batur L, Duralija B, Pavlić B i sur. (2022b) The application and optimization of HIPEF technology in the processing of juice from strawberries harvested at two stages of ripeness. *Foods*, 2022, **11**, 1997. <https://doi.org/10.3390/foods11141997>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić I i sur. (2022a) Chemometric valorization of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the reduction of functional juice: the impact of physicochemical, toxicological, sensory, and bioactive value. *Foods* **11(5)**, 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>

BIONITY (2023) Pro-oxidant. BIONITY Encyclopedia, <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Pro-oxidant.html>. Pristupljeno 24. siječnja 2023.

BioTek (2021) An introduction to reactive oxygen species – measurement of ROS in cells. BioTek, <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>. Pristupljeno 25. siječnja 2023.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *J Annals of Botany* **91(2)**, 179-194. e3. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>

BRAND (2023) Counting chambers, Bürker Türk pattern. BRAND- Blaubrand, <https://shop.brand.de/en/counting-chambers-burker-turk-pattern-blaubandr-p955.html>.

Pristupljeno 12. siječnja 2023.

Britannica (2022) Strawberry. Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/plant/strawberry> . Pristupljeno 20. siječnja 2023.

Bursać Kovačević D, Brdar D, Fabečić P, Barba FJ, Lorenzo JM, Putnik P (2020) Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. U: Barba FJ, Putnik P, Bursać Kovačević D (ured.) Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability. 1. izd., Academic Press, str. 51-88.

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016). Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem*, **190** (1), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>

Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* **10**, 357-382. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.10.070190.002041>

Calasso M, Gobbetti M (2011) Lactic acid bacteria | *Lactobacillus* spp.: other species. U: Fuquay JW (ured.), Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press, Mississippi State, USA, str. 125-131.

Cárdenas-Valdovinos JG, Oyoque-Salcedo G, Loeza-Lara PD, Oregel-Zamudio E, Angoa-Pérez MV, Mena-Violant HG (2018) Antibacterial potential of anthocyanic extracts of strawberry on *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis. *Acta Univ* **28(5)**. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1630>

Cleveland Clinic (2023) *E. Coli* infection, <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/16638-e-coli-infection> . Pristupljeno 29. siječnja 2023.

Chunyang L, Han W, Kabo M, Lovemore NM, Yuwei S (2020) Strawberries. U: Amit KJ (ured.) Nutritional composition and antioxidant properties of fruits and vegetables, Academic Press, str. 423-435.

- Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Mol Bio* **594**, 57-72. e3. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- EUFIIC (2006) What are functional foods and how they can help us?. EUFIIC – European Food Information Council, <https://www.eufic.org/en/food-production/article/functional-foods>.
Pristupljeno 18. siječnja 2023.
- Forbes-Hernandez TY, Gasparriini M, Afrin S, Bompadre S, Mezzeti B, Quiles JL, Giampieri F, Battino M (2015) The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity?. *J Nutr and Health* **56**, 46-59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>
- Forbes- Hernandez TY, Gasparriini M, Afrin S, Mazzoni L, Reboredo P, Giampieri F (2016) A comparative study on cytotoxic effects of strawberry extract on different cellular models. *J of Berry res* **6(3)**, 263-275.e3.<https://doi.org/10.3233/JBR-160124>
- Fritsch RJ, Krause I (2003) Electrophoresis. U: Caballero B (ured.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Academic Press, str. 2055-2062.
- Giampieri F, Álvarez- Suárez JM, Tulipani S, González-Parmas AM, Santos-Buelga C, Bompadre S, Quiles JL, Mezzeti B, Battino M (2012) Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblast. *J Agric Food Chem* **60**, 2322-2327.e3.<https://doi.org/10.1021/jf205065x>
- Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2011) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *J of Nutr* **28**, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparriini M, Alvarez- Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *J Food and Func* **6**, 1386-1398. <https://doi.org/10.1039/C5FO00147A>
- Goldman L, Schafer A (2020) *Goldman-Cecil Medicine*, 26 izd., Elsevier, str. 1927-1930.
- Golovinskaia O, Wang CK (2021) Review of functional and pharmacological activities of Berries. *Molecules* **26(13)**, 3904.e3. <https://doi.org/10.3390/molecules26133904>
- Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2019) Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev of Food Sci and Tech* **11(3)**, 1-26. DOI: 10.1146/annurev-food-032519-051708

Greenberg MM (1999) Comprehensive natural products chemistry, 1 izd., Pergamon, USA, str. 371-425.

Gyawali R, Ibrahim SA (2012). Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiol and Biotech* **95(1)**, 29-45.e3. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4117-x>

Harvard (2023) Antioxidants. Harvard T.H. Chan- School of Public Health, <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/antioxidants/>. Pristupljeno 23. siječnja 2023.

He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X (2017) Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *J Cell Physiol Biochem* **44**, 532-553.e3. <https://doi.org/10.1159/000485089>

Hirano T, Tamae K (2010) Heavy metal-induced oxidative DNA damage in earthworms: a review. *Applied and Env soil Sci* **2010**.e3. <https://doi.org/10.1155/2010/726946>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N (2016) oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 9. e3. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

Inayat- Hussain S, Rajab NF, Siew EL (2009). *In vitro* testing of biomaterials toxicity and biocompatibility. U: Di Silvo L (ured.), Cellular response to Biomaterials, Woodhead Publishing, str. 508-537.

Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J of Applied Microbiol* **123(3)**, 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.134684>

Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Önning G, Åkesson B, Cirenajawis HM, Oredsson SM (2010) The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr and Cancer* **63(4)**, 611-622. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.538486>

Lee JM (2008) DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **67(5)**, 377-387.e3. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816ff780>

Lopes da Silva F, Escribano-Bailón MT, Pérez Alonso JJ, Rivas- Gonzalo JC, Santos- Buelga C. (2007) Anthocyan pigments in strawberry. *J Food Sci and Tech* **40(2)**, 374-382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>

Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520-532. e3. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>

Mayo Clinic (2022) Staph Infections, Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/staph-infections/symptoms-causes/syc-20356221>. Pristupljeno 31. siječnja 2023.

Microbz (2023) Lactobacillus fermentum. Microbz – Microbzpedia, <https://microbz.co.uk/lactobacillus-fermentum/> . Pristupljeno 2. veljače 2023.

MN (2022) About Staphylococcus aureus. MN – Department of health, <https://www.health.state.mn.us/diseases/staph/basics.html#:~:text=symptoms%20and%20complications.-,S.,infections%20are%20not%20serious%2C%20S.> Pristupljeno 31. siječnja 2023.

Nagmouchi K, Belguesmia Y, Bendali F, Spano G, Seal BS, Drider D (2015) *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60(20)**, 3387-3399. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>

NCBI PubChem (2023) Pelargonidin 3-glucoside. NCBI PubChem- National Centre for Biotechnology Information, PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pelargonidin-3-glucoside>. Pristupljeno 22. siječnja 2023.

NIH (2013) Antioxidants: In Depth. NIH- National Institute of Health, <https://www.nccih.nih.gov/health/antioxidants-in-depth>. Pristupljeno 23. siječnja 2023.

NIH (2023) Electrophoresis. NIH- National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>. Pristupljeno 18. siječnja 2023.

NIH (2023) Probiotic markedly reduces *S. aureus* colonization ih Phase 2 trial. NIH - National Institue of Health, <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/probiotic-markedly-reduces-s-aureus-colonization-phase-2-trial>. Pristupljeno 2. veljače 2023.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *J Oxid Medicine and Cell Longev* **2017**, 13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

Plamada D, Vodnar DC (2022) Polyphenols—gut microbiota interrelationship: a transition to a new generation of prebiotics. *Nutrients* **14(1)**, 137.e3. <https://doi.org/10.3390/nu14010137>

Pukalskiene M, Pukalskas A, Dienaite L, Revinyte S, Pereira CV, Matias AA, Venskutonis Rimantas P (2021) Recovery of bioactive compounds from strawberry (*Fragaria × ananassa*) pomace by conventional and pressurized liquid extraction and assessment their bioactivity in human cell cultures. *Foods* **10 (8)**, 1780. <https://doi.org/10.3390/foods10081780>

Rincón-León F (2003) Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2 izd., Academic press, Španjolska, str. 2827-2832.

Sangiovanni E, Fumagalli M, Dell'Agli M (2017) Gastrointestinal tissue: oxidative stress and dietary antioxidants, 1 izd., Academic press, Italija, str. 243-258.

Seleshe S, Lee JS, Lee HJ, Kim GR, Yeo J, Kim JY, Nam Kang S (2017) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of three kinds of strawberries. *Prev Nutr Food Sci* **22(3)**, 203-2010.e3. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.3.203>

Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Rev* **21**, 363-383.e3. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

SigmaAldrich (2023) DNA Damage and Repair. SigmaAldrich – MERCK, <https://www.sigmaaldrich.com/BA/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cancer-research/dna-damage-and-repair> . Pristupljeno 28. siječnja 2023.

Sitorus EK, Purwaningsih S, Wahyunitisari MR (2012) antibacterial effect of strawberry (*Fragaria x ananassa*) extract on pathogenic serotype 1-11 *Escherichia coli* revealed using dilution method. *Folia Medica Indonesiana* **48(4)** , 167-73. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1630>

Sotler R, Poljšak B, Dahmane R, Jukić T, Pavan Jukić D, Rotim C, Trebše P, Starc A (2019) Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *J Acta Clin Croat* **58(4)**, 726-736. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.20>

Souza Rosa L, Jordao NA, Costa Pereira Soares N, Mesquita JF, Monteiro M, Junger Teodoro A (2018) Pharmacokinetic, antiproliferative and apoptotic effects of phenolic acids in human colon adenocarcinoma cells using in vitro and in silico approaches. *Molecules* **23(10)**, 2569. <https://doi.org/10.3390/molecules23102569>

Sun J, Zhou W, Huang D, Fuh JY, Hong GS (2015) An overview of 3D printing technologies for food fabrication. *Food Bioproc Tech* **8**, 1605-1615. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1528-6>

ThermoFisher (2022) Cell Dissociation and Trypsin for Cell Culture. ThermoFisher – ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofischer.com/hr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/cell-dissociation.html>. Pristupljeno 12. siječnja 2023.

ThermoFisher (2022) phiX174 RF1 DNA. ThermoFisher – ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofischer.com/order/catalog/product/SD0031>. Pristupljeno 10. siječnja 2023.

Trafalgar Scientific (2023) Petri dishes. Trafalgar Scientific, <https://trafalgarscientific.co.uk/consumables/petri-dishes/>. Pristupljeno 12. siječnja 2023.

UC DAVIS (2018) *Lactobacillus fermentum*. UC DAVIS- Viticulture and enology , <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/lactobacillus-fermentum> . Pristupljeno 30. siječnja 2023.

Vrhovsek U, Guella G, Gasperotti M, Pojer E, Zancato M, Mattivi F (2012) Clarifying the identity of the main ellagitannin in the fruit of the strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *J Agric Food Chem* **60(10)**, 2507-2516. <https://doi.org/10.1021/jf2052256>

WebMD (2023) Health Benefits of Strawberries. WebMD – Doctor of Medicine over Internet, <https://www.webmd.com/diet/healthbenefitsstrawberry#:~:text=Strawberries%20are%20good%20for%20your%20whole%20body.,source%20of%20manganese%20and%20potassium> . Pristupljeno 20. siječnja 2023.

WebMD (2022) What is *E.coli*?. WebMD-Doctor of Medicine over Internet, <https://www.webmd.com/food-recipes/food-poisoning/what-is-e-coli> . Pristupljeno 29. siječnja 2023.

Wikimedia (2023) 96 – Well plate. Wikimedia, https://www.commons.oorg/wiki/File:96-Well_plate.svg. Pristupljeno 15. siječnja 2023.

Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg* **47**, 249-255. e3.<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

ZOV (2022) Jagodica Purgerica i Srčeko, jestivi suveniri prigodno su predstavljani za Valentinovo. ZOV – Zagrebačke Otpadne Vode, <https://www.zov-zagreb.hr/hr/novosti/jagodica-purgerica-i-srceko-jestivi-suveniri-prigodno-su-predstavljani-na-valentinovo.html>. Pristupljeno 19. siječnja 2023.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Esma Hadžimeragić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.
